

명세서

발명의 명칭: 신규 이중 특이성 융합단백질 및 그의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 신규 이중 특이성 융합단백질 및 그의 용도에 관한 것으로서, 구체적으로는 GLP-1 유사체 및 GLP-2 유사체를 포함하되, GLP-1 유사체의 활성화 및 GLP-2 유사체의 활성화가 정밀하게 조절된 이중 특이성 융합단백질 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] GLP-1 및 GLP-2는 모두 프로글루카곤이라는 전구체로 발현되어 일련의 조직특이적 단백질 절단 과정을 거쳐서 생성이 되는 펩타이드 호르몬이다. 이 중, GLP-1은 음식 섭취 시 소장 of 장내분비(enteroendocrine) L-세포 및 뇌간(brain stem)의 고립 속(solitary tract) 핵 내의 특정 신경세포에서 생산되어 분비되는데, 최초 산물인 GLP-1(1-37)은 쉽게 아마이드화되며 절단에 의해 두 가지의 동등한 생물학적 활성을 가진 절단된 형태(GLP-1(7-36) 아마이드 및 GLP-1(7-37))로 전환되며 활성 GLP-1은 포도당-의존적으로 혈당 수준을 낮추는 역할을 수행하기 때문에, 제2형 당뇨병 치료제로 개발되어 사용되고 있다. 아울러, GLP-2는 GLP-1과 마찬가지로 프로글루카곤의 특별한 번역 후 절단 공정에 의해 생성되는 33 아미노산 길이의 펩타이드로서 소장의 장내분비 L 세포와 중추신경계의 다양한 신경세포에서 생산이 되며, 음식 섭취 시 소장에서 GLP-1과 함께 분비가 된다. GLP-2의 경우 투여 시 소장 성장 및 기능을 향상시키고, 뼈의 파괴를 감소시키며 신경보호작용을 하는 것으로 알려지고 있어, 현재 단장증후군이나 크론병, 골다공증과 같은 질환의 치료제로 개발되고 있다.
- [3] GLP-1은 상술한 바와 같이 원래 제2형 당뇨병 환자의 치료에서 포도당 항상성에 대한 유의한 효과로 주목을 받았으나(Gutniak *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 326: 1316-1322, 1992), 이 역시 GLP-2와 유사하게 위장 분비와 운동성을 감소시킨다는 연구결과를 통해 단장증후군의 치료에서의 역할이 암시된 바 있다(Kunkel *et al.*, *Neurogastroenterol. Motil.* 23: 739-e328, 2011). 아울러, GLP-1에 의한 GLP-1 수용체(GLP-1R) 신호전달 체계의 활성화에 의해 장의 성장 및 소장샘 세포(crypt cell)의 융합이 촉진되는 것이 보고된 바 있다(Koehler *et al.*, *Cell Metabol.* 21(3): 379-391, 2015). 이러한 기전을 바탕으로, Naia 사에서는 GLP-1에 반감기 연장 펩타이드인 XTEN이 연결된 GLP-1-XTEN을 이용하여 단장증후군에 대한 임상 1상 시험을 진행 중에 있다. 더 나아가, GLP-1과 GLP-2의 병용 투여 시 각각의 펩타이드 단독 투여 시에 비해 소장 흡수에 있어서 상가적인 효과가 나타났다고 보고된 바 있다(Madsen *et al.*, *Regul. Pept.* 184: 30-39, 2013).
- [4] 한편, 대사이상연관 지방간질환(metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, MASLD)은 한 가지 질병이라기 보다 염증을 동반하지 않는 단순 지방간

에서부터 만성 간염, 간경변증에 이르는 다양한 형태의 간질환을 포함하며, 비만 및 그에 따른 인슐린 저항성과 밀접하게 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. 대사이상연관 지방간질환은 단순히 지방만 끼어 있고 간세포 손상은 없는 가벼운 지방간으로부터, 간세포 손상이 심하고 지속되는 지방간염, 심지어는 복수나 황달 등을 동반하는 간섬유화 또는 간경변증(간경화)이 생기는 경우까지 병의 정도가 매우 다양할 수 있으며, 더 진행되면 간암으로까지 진행되는 것으로 알려져 있을 뿐 아니라, 서구적인 식습관의 만연에 따른 서구형 질환으로 발생 빈도가 급격하게 증가하고 있는 질환이다. 대부분의 대사이상연관 지방간질환은 가벼운 병이지만, 심한 지방간 환자 4명 중에 한 명은 치료를 하지 않고 방치되었을 경우 서서히 시간이 지남에 따라 심각한 간질환인 간경변증(또는 간섬유증)으로 진행되는 바, 결코 무시할 수 있는 증상이 아니라고 할 수 있다. 대사이상연관 지방간질환의 유병률은 인구집단의 특성에 따라 다양하게 보고되는데 일반인의 10~24%, 비만인의 58~74%까지 보고되고 있다. 그러나, 현재까지 대사이상연관 지방간질환 또는 대사이상연관 지방간염의 치료제로 승인된 약물은 아직까지 없는 상황으로, 대사이상연관 지방간질환의 치료제의 개발은 매우 시급한 과제로 간주되고 있다.

- [5] 이와 관련하여, 본 발명자들은 GLP-1R 및 GLP-2R을 동시에 표적화 하는 이중 특이성 단백질을 개발한 바 있다(대한민국 특허 제10-2349718호).

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 그러나, 상기 이중 특이성 융합단백질은 단장증후군과 비만, 제2형 당뇨병, 대사이상연관 지방간염 등 다양한 대사성 질환에 대하여 범용으로 사용될 수 있으나, 대사성 질환에 더 적합한 형태의 이중 특이성 융합단백질에 대한 내용은 전혀 개시하고 있지 않다.
- [7] 이에, 본 발명은 상술한 문제점을 포함하여 여러 가지 문제점을 해결하기 위한 것으로서, GLP-1 및 GLP-2의 기능을 유지하면서도, 대사성 질환의 치료에 보다 적합한 활성을 갖는 새로운 이중 특이성 융합단백질을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나, 본 발명의 보호범위가 상기 목적으로 제한되는 것은 아니다.

과제 해결 수단

- [8] 본 발명의 일 관점에 따르면, GLP-1 유사체 및 GLP-2 유사체가 융합된 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 GLP-1 유사체의 활성은 야생형 GLP-1(인간 GLP-1 펩타이드) 대비 40% 이상이고, 상기 GLP-2 유사체의 활성은 야생형 GLP-2(인간 GLP-2 펩타이드) 대비 50% 이하인, 이중 특이성 융합단백질이 제공된다.
- [9] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, GLP-1 유사체가 항체 Fc 영역에 연결된 제1융합단백질 및 GLP-2 유사체가 항체 Fc 영역에 연결된 제2융합단백질을 포함하며, 상기 제1융합단백질 및 제2융합단백질의 이량체화에 의해 생성되는 이

중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 GLP-1 유사체의 활성은 야생형 GLP-1(인간 GLP-1 펩타이드) 대비 40% 이상이고, 상기 GLP-2 유사체의 활성은 야생형 GLP-2(인간 GLP-2 펩타이드) 대비 50% 이하인, 이중 특이성 융합단백질이 제공된다.

- [10] 본 발명의 일 관점에 따르면, 상기 이중 특이성 융합단백질을 포함하는 조성물이 제공된다.
- [11] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 중 어느 하나 이상의 이중 특이성 융합단백질을 유효성분으로 포함하는, 대사성 질환 치료용 약학적 조성물이 제공된다.
- [12] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 대사성 질환의 치료에 사용되는 상기 중 어느 하나의 이중 특이성 융합단백질이 제공된다.
- [13] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 대사성 질환 치료제의 제조에 있어서, 상기 중 어느 하나의 이중 특이성 융합단백질의 용도가 제공된다.
- [14] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 치료적으로 유효한 양의 상기 이중 특이성 융합단백질을 대사성 질환에 걸린 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 상기 개체의 대사 관련성 질환을 치료하는 방법이 제공된다.

발명의 효과

- [15] 본 발명의 이중 특이성 융합단백질은 생체 내 투여 시 대사증후군, 비만, 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 대사이상연관 지방간질환, 간섬유증과 같은 대사성 질환의 치료에 매우 효율적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [16] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질의 개략적인 구조를 나타내는 개요도이다.
- [17] 도 2a는 본 발명의 비교예인 GLP-2 동형 이량체(GLP-2-Fc homodimer, 좌측)와 Knobs-into-Holes 구조를 포함한 MG12-5(우측)을 정제한 후 비환원(NR) 및 환원(R) 조건에서 SDS-PAGE 분석한 결과를 나타내는 일련의 겔 사진이다:
 - [18] M: size marker;
 - [19] 1 & 2: GLP-2-Fc homo(10 μ g); 및
 - [20] 3 & 4: MG12-5(10 μ g).
- [21] 도 2b는 본 발명의 일 실시예에 따른 MG12-6을 환원 및 비환원 조건에서 SDS-PAGE 분석한 결과를 나타내는 일련의 겔 사진이다:
 - [22] M: size marker;
 - [23] 1: MG12-6; 및
 - [24] C: Ctrl (3 μ g)-Herceptin.
- [25] 도 2c는 본 발명의 일 실시예에 따른 MG12-7 및 MG12-8을 환원 및 비환원 조건에서 SDS-PAGE 분석한 결과를 나타내는 일련의 겔 사진이다:
 - [26] M: size marker;

- [27] 1: MG12-7;
- [28] 2: MG12-8; 및
- [29] 3: Ctrl (3 μ g)-Herceptin.
- [30] 도 2d는 본 발명의 일 실시예에 따른 MG12-9를 환원 및 비환원 조건에서 SDS-PAGE 분석한 결과를 나타내는 겔 사진이다:
- [31] 1: Reducing MG12-9;
- [32] 2: Non-reducing MG12-9; 및
- [33] 3: Ctrl (3 μ g)-BSA.
- [34] 도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합 단백질(MG12-8)의 단독 투여 시 체중감량 효과를 분석하기 위한 실험 스케줄 및 약물 투여량, 투여 간격 등을 개략적으로 정리하여 나타낸 개요도이다. 도 3b는 상기 도 3a의 스케줄에 따라 수행된 실험결과 실험동물의 체중 변화를 나타낸 그래프이다. 도 3c는 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합 단백질(MG12-8)의 반복 투여 시 체중 감량 효과를 분석하기 위한 실험 스케줄 및 약물 투여량 및 투여 간격 등을 개략적으로 나타낸 개요도이다. 도 3d는 상기 도 3c에 도시된 스케줄 대로 수행된 실험결과 실험동물의 체중 변화량을 나타낸 그래프이다. 도 3e는 상기 도 3d의 실험 종료 후 희생시킨 실험동물의 담낭의 부피를 측정된 결과를 나타내는 그래프이다. NS는 통계적으로 유의하지 않음을, **는 $p < 0.01$ 의 통계적 유의성을 나타내며, 에러바는 표준오차(SEM)를 나타낸다.
- [35] 도 4a는 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질의 장 누수 동반 대사이상연관 지방간에 대한 치료효과를 검증하기 위한 실험 스케줄 및 약물 투여량, 투여간격 등을 정리하여 나타낸 개요도이다. 도 4b는 상기 도 4a에 도시된 스케줄대로 수행된 동물실험 종료 후 실험동물의 체중을 측정하여 나타낸 그래프이다. 도 4c는 상기 도 4b의 실험동물의 희생 4시간 전 경구 투여된 FITC-Dextran의 혈청내 형광정도를 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.
- [36] 도 5a는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 다양한 시료의 이중 특이성 융합단백질의 시험관 내 GLP-1 활성을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른 다양한 시험관 내 GLP-1 활성을 갖는 이중 특이성 융합단백질 시료의 생체 내 GLP-1 활성을 분석하기 위한 복강투여 내당능 검사 실험 스케줄 및 투여 약물의 투여량, 투여 간격 등을 정리하여 나타낸 개요도이다. 도 5c는 도 5b에 도시된 스케줄 대로 수행된 복강투여 내당능 검사 결과를 나타내는 그래프이다. 상기 그래프들에서 *는 $p < 0.05$ 수준의 통계적 유의성을, **는 $p < 0.01$ 수준의 통계적 유의성을 나타낸다.
- [37] 도 6a는 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질 투여에 따른 체중 변화율(좌측) 및 비지방 대비 지방 비율의 변화율(우측)을 공지의 GLP-1R/GLP-2R 이중 작용제인 Dapiglutide mimetic과 비교하여 측정된 결과를 나타내는 일련의 그래프이다. 도 6b는 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질의 투여량에 따른 체중 변화율의 변화를 나타낸 그래프이다. 도 6c는 본 발명의

일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질의 체중 변화에 미치는 영향을 동일 용량의 GLP-1-Fc 및 GLP-2-Fc 단순 병용 투여와 비교하여 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 6d는 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질의 고지방 식이에 의해 유발된 식이-유도 비만 모델 동물에서 체중 변화율을 GLP-1R/GIPR 이중 작용제인 Tirzepatide mimetic과 비교하여 나타낸 그래프이다. 도 6e는 도 6d의 실험에서 실험동물의 지방조직의 무게 변화율을 측정된 결과를 나타낸 그래프이다. 도 6f는 상기 도 6d의 실험에서 실험동물의 비지방조직의 무게 변화율을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다. 도 6g는 고지방 식이에 의해 비만이 유도된 식이-유도 비만 모델 동물에서 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질의 피하지방율(좌측) 및 내장지방율(우측)을 측정된 결과를 나타낸 그래프이다. 양성 대조군으로 Tirzepatide mimetic을 사용하였다. 상기 그래프들에서 N.S는 통계적으로 유의미하지 않음을 나타내고, *는 $p < 0.05$ 수준의 통계적 유의성을, **는 $p < 0.01$ 수준의 통계적 유의성을 나타낸다.

- [38] 도 7a는 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 단백질의 고지방 식이에 의해 비만이 유도된 식이-유도 비만 모델 동물에서 내독소혈증(endotoxemia) 감소효과를 분석하기 위한 혈청 내 LPS 농도를 측정된 결과를 나타내는 그래프이다. 도 7b는 상기 도 7a의 실험동물에서 간손상 억제 효과를 분석하기 위한 혈청 내 ALT 농도를 측정된 결과를 나타내는 그래프이다. 상기 그래프들에서 *는 $p < 0.05$ 수준의, **는 $p < 0.01$ 수준의 통계적 유의성을 나타낸다.
- [39] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질의 인슐린-자극 포도당 흡수 분석결과를 나타내는 일련의 그래프로서, (a) 분화된 3T3-L1 지방세포의 GLP-1R 및 GLP-2R의 표면 발현 정도를 측정된 정규화된 평균 형광 강도, (b, c) 분화된 3T3-L1 지방세포의 인슐린-자극 포도당 흡수 정도, (d) 분화된 L6-GLUT4myc 근모세포(myoblast)의 GLP-1R 및 GLP-2R의 표면 발현 정도를 측정된 정규화된 평균 형광 강도, 및 (e, f) 분화된 L6-GLUT4myc 상기 그래프들에서 *는 $p < 0.05$ 수준의 통계적 유의성을, **는 $p < 0.01$ 수준의 통계적 유의성을 나타낸다.
- [40] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질 투여시 혈당 강화 및 당화혈색소의 변화, 그리고 인슐린 저항성에 미치는 영향을 나타내는 일련의 그래프로서, (a) 비공복 혈당 수치, (b) 당화혈색소(HbA1c)의 수치, (c) 공복 혈당 수치, (d) 공복 인슐린 농도, (e) HOMA-IR 점수, 및 (f) HOMA- β 점수를 나타낸다. 상기 그래프들에서 *는 $p < 0.05$ 수준의 통계적 유의성을, **는 $p < 0.01$ 수준의 통계적 유의성을 나타낸다.
- [41] 도 10은 상기 도 9의 실험 종료 후 적출된 췌장에 대한 조직학적 분석결과를 나타내는 것으로서, (a-c) 췌장 조직 박편에 대한 면역조직화학 분석 결과로 (a) 인슐린, (b) 인슐린 및 글루카곤, (c) 인슐린 및 Ki-67 양성 세포를 염색한 결과를 나타내는 현미경 사진, 및 (d) 췌도 면적, (e) 베타-세포 영역, (f) 알파-세포 영역, (g) 베타-/알파-세포 비율, 및 (h) 10,000 μm^2 당 Ki-67 양성 세포의 수를 각각 나타내

는 그래프이다. 상기 그래프들에서 *는 $p < 0.05$ 수준의 통계적 유의성을, **는 $p < 0.01$ 수준의 통계적 유의성을 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[42] 용어의 정의:

[43] 본 문서에서 사용되는 용어 "GLP-1"은 "글루카곤-유사 펩타이드-1(glucagon-like peptide-1)"의 약어로서 프로글루카곤 펩타이드의 조직-특이적인 번역 후 가공에 의해 유도되는 30 또는 31 아미노산 길이의 펩타이드 호르몬이다. GLP-1은 음식 섭취 시 소장의 장내분비(enteroendocrine) L-세포 및 뇌간(brain stem)의 고립 속(solitary tract) 핵 내의 특정 신경세포에서 생산되어 분비된다. 최초 산물인 GLP-1(1-37)은 쉽게 아마이드화되며 절단에 의해 두 가지의 동등한 생물학적 활성을 가진 절단된 형태(GLP-1(7-36) 아마이드 및 GLP-1(7-37))로 전환된다. 활성 GLP-1은 아미노산 위치 13-20 및 24-35의 두 개의 알파-나선 부위와 상기 두 알파-나선 부위를 연결하는 링커 지역을 포함한다. GLP-1은 포도당-의존적으로 혈당 수준을 낮추는 역할을 수행하기 때문에, 제2형 당뇨병 치료제로 개발되어 사용되고 있다. 그러나, 생체 내에서 GLP-1은 디펩티딜 펩티데이즈-4(DPP-4)에 의해 신속하게 분해되기 때문에 생체 내 반감기가 2분에 불과하여, 자연 상태의 펩타이드로는 그 효과가 극히 제한적이다.

[44] 본 문서에서 사용되는 용어 "GLP-2"는 GLP-1과 마찬가지로 프로글루카곤의 번역 후 절단 공정에 의해 생성되는 33 아미노산 길이의 펩타이드로서 소장의 장내분비 L 세포와 중추신경계의 다양한 신경세포에서 생산이 된다. GLP-2는 음식 섭취 시 GLP-1과 함께 분비가 된다. GLP-2의 경우 투여 시 소장 성장 및 기능을 향상시키고, 뼈의 파괴를 감소시키며 신경보호작용을 하는 것으로 알려지고 있어, 현재 단장증후군이나 크론병, 골다공증과 같은 질환의 치료제로 개발되고 있다.

[45] 본 문서에서 사용되는 용어 "GLP-1 유사체"는 생물학적으로 GLP-1의 기능을 수행하는 단백질로서 GLP-1/Exendin-4 수용체에 결합하여 하류 신호전달을 매개할 수 있는 단백질을 의미하며, "GLP-1 수용체 작용제"로도 지칭된다.

[46] 본 문서에서 사용되는 용어 "GLP-2 유사체"는 생물학적으로 GLP-2의 기능을 수행하는 단백질로서 GLP-2 수용체에 결합하여 하류 신호전달을 매개할 수 있는 단백질을 의미하며, "GLP-2 수용체 작용제"로도 지칭된다.

[47] 본 발명에서 사용되는 용어 "융합단백질"은 둘 이상의 단백질 또는 단백질 내 특정 기능을 담당하는 도메인이 각각의 단백질 또는 도메인이 본연의 기능을 담당하도록 연결된 재조합 단백질(recombinant protein)을 의미한다.

[48] 본 문서에서 사용되는 용어 "반감기 증가 모이어티"는 재조합 단백질에 연결되어, 당해 재조합 단백질의 체내 반감기를 향상시키기 위한 기능기를 의미한다. 이러한 "반감기 증가 모이어티"로는 항체 Fc 영역(Capon *et al.*, Nature. 337: 525-531, 1989), PEG(Caliceti and Veronese, *Adv. Drug Delivery Rev.* 55:

1261-1277, 2003), XTEN(Schellenberger *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 27: 1186-1190, 2009), PAS(Pro-Ala-Ser, Schlapschy *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.* 26: 489-501, 2013), ELP(elastine-like peptide, Floss *et al.*, *Trends Biotechnol.* 28: 37-45, 2010), 클리신-풍부 HAP(homo-amino-acid polymer, Schlapschy *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.* 20: 273-284, 2007), GLK(gelatine-like protein, Huang *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 74(3): 435-441, 2010), 및 혈청 알부민(Sheffield *et al.*, *Cell Physiol. Biochem.*, 45(2): 772-782, 2018) 등이 사용될 수 있으며, 이와 같은 단백질에 부가되는 "반감기 증가 모이어티"에 대하여는 리뷰 논문 등을 통해 잘 알려져 있다(Strohl, W. R., *BioDrugs*, 29(4): 215-239, 2015). 이에, 상기 개별 인자들에 대한 선행논문 및 상기 리뷰 논문들은 본 문서에 참조로 삽입이 된다.

- [49] 본 문서에서 사용되는 용어 "항체 Fc 영역"은 항체를 파파인으로 절단하였을 때 생성되는 단편 중 결정화되는 단편(crystallized fragment)을 의미하며, Fc 수용체라고 지칭되는 세포 표면 수용체 및 보체계(complement system)의 몇몇 단백질과 상호작용을 한다. Fc 영역은 중쇄의 두 번째 및 세 번째 불변 영역(CH2 및 CH3)을 포함하는 단편이 힌지 부분에서 분자 간 이황화 결합에 의해 연결된 동형 이량체 구조를 나타낸다. IgG의 Fc 영역은 다수의 N-글리칸 부착 부위를 가지고 있으며, 이는 Fc 수용체-매개 작용에 있어서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.
- [50] 본 문서에서 사용되는 용어 "하이브리드 Fc 영역"은 다양한 서브타입의 Ig Fc 영역의 부분들의 조합에 의해 생성된 Fc 영역 펩타이드를 의미하며, 이러한 Fc 영역의 부분들의 조합에 의해 Fc 수용체 및 보체와의 결합능에 있어서 야생형 Fc 영역과 차이를 나타낼 수 있다.
- [51] 본 문서에서 사용되는 용어 "Exendin"은 도마뱀 *Heloderma suspectum*의 독에서 분리된 39 아미노산으로 구성된 펩타이드이다. Exendin 4는 GLP-1과 아미노산 서열상 50% 동일하며, 글루카곤 펩타이드 패밀리의 일원으로, GLP-1 수용체의 작용제로서 GLP-1과 동등한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. Exendin 4는 "extenatide"로도 불린다. Exendin 3는 상기 Exendin 4에서 두 번째 및 세 번째 아미노산이 각각 세린 및 아스파르트산으로 치환된 변이체이다.
- [52] 본 문서에서 사용되는 용어 "Lixisenatide"는 GLP-1 수용체 작용제 중 하나로써, Sanofi사에 의해 제조되어, 유럽에서는 Lyxumia라는 상품명으로, 미국에서는 Adlyxin이라는 상품명으로 제2형 당뇨병 치료를 위한 일일 투여 주사제로 판매되고 있는 약물이다.
- [53] 본 문서에서 사용되는 용어 "Albiglutide"는 GSK사에 의해 유럽에서는 Eperzan이라는 상품명으로, 미국에서는 Tanzeum이라는 상품명으로 제2형 당뇨병 치료제로 판매되고 있는 GLP-1 수용체 작용제 중의 하나이다.
- [54] 본 문서에서 사용되는 용어 "Liraglutide"는 Novo Nordisk사에 의해 "Victoza"라는 상품명으로 제2형 당뇨병 및 비만 치료제로 판매되고 있는 피하주사형 GLP-1 수용체 작용제이다.

- [55] 본 문서에서 사용되는 용어 "Taspoglutide"는 Ipsen사와 Roche사에 의해 공동개발된 GLP-1 수용체 작용제로 제2형 당뇨병 치료제로, GLP-1(7-36) 펩타이드의 8번째 및 35번째 아미노산인 알라닌이 메틸화되어 있고 마지막 아미노산이 아마이드화되어 있는 GLP-1 유도체이다. 단, 다른 펩타이드와 융합단백질의 형태로 제조될 경우에는 C-말단이 아마이드화되지 않고 일반적인 카르복실기인 경우도 무방하다.
- [56] 본 문서에서 사용되는 용어 "Semaglutide"는 GLP-1R 작용제로서 제2형 당뇨병 치료제로 사용되는 경구 혈당 강하제이자 장기적인 체중 관리에 사용되는 항비만제로, 2012년 Novo Nordisk사에 의해 개발되어 2017년 미국에서 판매가 승인된 약물이다.
- [57] 본 문서에서 사용되는 용어 "Tirzepatide"는 GLP-1R 작용제의 일종으로서, 현재 2형 당뇨병 및 체중 감소를 위한 목적으로 사용이 되고 있으며, Eli Lilly사에 의해 개발되어 2022년 미국에서 판매가 승인된 약물이다.
- [58] 본 문서에서 사용되는 용어 "Dapiglutide"는 Zealand Pharma사에서 개발된 GLP-1R 및 GLP-2R 이중 작용제로서, 현재 임상 1상 시험이 진행 중이다..
- [59] 본 문서에서 사용되는 용어 "XTEN"은 Amunix사에 의해 개발된 단백질 의약품의 생체 내 반감기를 향상시키기 위해 부가되는 6개의 아미노산을 포함하는 비구조화된(unstructured) 저면역원성 펩타이드로서 통상 144 a.a를 단위로 하여 그의 배수의 아미노산으로 구성되어 있다(US2010/0239554A1).
- [60] 본 문서에서 사용되는 용어 "Teduglutide"는 GLP-2의 2번째 아미노산인 알라닌(A)이 글라이신(G)로 치환된 돌연변이체로서 미국에서는 Gattex라는 상품명으로, 유럽에서는 Revestive라는 상품명으로 단장증후군 치료제로 판매되고 있는 GLP-2 유사체이다.
- [61] 본 문서에서 사용되는 용어 "Glepaglutide"는 반감기가 향상된 GLP-2 유사체로 단장증후군 치료제로 개발되어 현재 단장증후군에 대하여 임상 3상 시험을 진행 중인 약물이다.
- [62] 본 문서에서 사용되는 용어 "GLP-2 analogue 10"는 GLP-2 유사체 중 하나로서 GLP-2의 11번째 및 18번째 아미노산을 시스테인으로 치환하여 두 치환된 시스테인의 티올기를 통해 지질화된 분자 내 가교제가 연결됨으로써 안정화된 구조를 갖게 되고, C-말단에 Exendin 4의 C-말단의 9개 아미노산을 부가한 것을 특징으로 한다(Yang *et al.*, *J. Med. Chem.* 61: 3218-3223, 2018).
- [63] 본 문서에서 사용되는 용어 "링커 펩타이드"는 둘 이상의 다른 생물학적 활성을 가진 단백질 또는 펩타이드를 연결하여 융합단백질을 제조할 때 사용되는 비구조화된 펩타이드이다.
- [64] 본 문서에서 사용되는 용어 "대사성 질환(metabolic disorder)"은 생체 내에서 섭취된 음식으로부터 에너지를 얻어내는 일련의 과정인 대사과정이 비정상적으로 이루어져 발생하는 질환을 총칭하는 것으로서, 특히 탄수화물 대사의 조절 실패로 인해서 발생하는 비만, 당뇨병 등의 질환이 대표적이다. 이러한 대사성 질환

의 원인으로는 유전적인 요인이나, 환경적 요인 등 다양한 원인이 제기되고 있는데, 최근에는 유전적 요인에 더하여 탄수화물 위주의 식습관이 주된 원인으로 지목되고 있는 상황이다. 이러한 대사성 질환에는 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병 등의 당뇨병, 비만, 대사증후군(metabolic syndrome), 대사이상연관 지방간 질환, 대사이상연관 지방간염, 및 간경변 등이 포함된다.

[65] 본 문서에서 사용되는 용어 "대사증후군(metabolic syndrome)"은 인슐린 저항성이 원인인 것으로 추정되는 질환으로 콜레스테롤, 혈압, 혈당치 중 2개 이상의 수치에 이상이 생기는 증상을 의미한다. 각종 심혈관 질환과 제2형 당뇨병의 위험 요인들이 서로 군집을 이루는 현상을 한 가지 질환군으로 개념화시킨 것이다. 인슐린 저항성(IR) 및 이와 관련된 복잡하고 다양한 여러 대사이상과 임상양상을 모두 포괄하여 설명할 수 있는 유용한 개념이다. 대사증후군을 방치하면, 동맥경화, 심근경색, 뇌졸중 등 심혈관 질환 혹은 제2형 당뇨병의 발병 위험도가 증가하는 것으로 알려져 있다.

[66] **발명의 상세한 설명:**

[67] 본 발명의 일 관점에 따르면, GLP-1 유사체 및 GLP-2 유사체가 융합된 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 GLP-1 유사체의 활성은 야생형 GLP-1(인간 GLP-1 펩타이드) 대비 40% 이상이고, 상기 GLP-2 유사체의 활성은 야생형 GLP-2(인간 GLP-2 펩타이드) 대비 50% 이하인, 이중 특이성 융합단백질이 제공된다.

[68] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, GLP-1 유사체가 항체 Fc 영역에 연결된 제1융합단백질 및 GLP-2 유사체가 항체 Fc 영역에 연결된 제2융합단백질을 포함하며, 상기 제1융합단백질 및 제2융합단백질의 이량체화에 의해 생성되는 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 GLP-1 유사체의 활성은 야생형 GLP-1(인간 GLP-1 펩타이드) 대비 40% 이상이고, 상기 GLP-2 유사체의 활성은 야생형 GLP-2(인간 GLP-2 펩타이드) 대비 50% 이하인, 이중 특이성 융합단백질이 제공된다.

[69] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 GLP-1 유사체의 활성은 바람직하게는 시험관내 조건에서 야생형 GLP-1 대비 41% 이상, 또는 42% 이상, 또는 43% 이상, 또는 44% 이상, 또는 45% 이상, 또는 46% 이상, 또는 47% 이상, 또는 48% 이상, 또는 49% 이상, 또는 50% 이상, 51% 이상, 또는 52% 이상, 또는 53% 이상, 또는 54% 이상, 또는 55% 이상, 또는 56% 이상, 또는 57% 이상, 또는 58% 이상, 또는 59% 이상, 또는 60% 이상, 또는 61% 이상, 또는 62% 이상, 또는 63% 이상, 또는 64% 이상, 또는 65% 이상, 또는 66% 이상, 또는 67% 이상, 또는 68% 이상, 또는 69% 이상, 또는 70% 이상, 71% 이상, 또는 72% 이상, 또는 73% 이상, 또는 74% 이상, 또는 75% 이상, 또는 76% 이상, 또는 77% 이상, 또는 78% 이상, 또는 79% 이상, 또는 80% 이상, 81% 이상, 또는 82% 이상, 또는 83% 이상, 또는 84% 이상, 또는 85% 이상, 또는 86% 이상, 또는 87% 이상, 또는 88% 이상, 또는 89% 이상, 또는 90% 이상, 91% 이상, 또는 92% 이상, 또는 93% 이상, 또는 94% 이상,

또는 95% 이상, 또는 96% 이상, 또는 97% 이상, 또는 98% 이상, 또는 99% 이상, 또는 100% 이상의 활성을 가질 수 있음을 의미하고, 100% 이상 400% 이하의 활성을 가질 수도 이TEK.

[70] 더 구체적으로, 상기 GLP-1 유사체의 활성은, 시험관내 조건에서 야생형 GLP-1 대비 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 101%, 102%, 103%, 104%, 105%, 106%, 107%, 108%, 109%, 110%, 111%, 112%, 113%, 114%, 115%, 116%, 117%, 118%, 119%, 또는 120%일 수 있으며, 상기 백분율 중 임의의 값을 하한선으로 그 보다 큰 다른 값을 상한선으로 한 일정한 범위를 가질 수 있다.

[71] 아울러, 상기 GLP-1 유사체의 활성은 선택적으로 시험관내 조건에서 야생형 GLP-1 대비 120를 초과할 수 있으며, 더 구체적으로는 야생형 GLP-1 대비 121%, 122%, 123%, 124%, 125%, 126%, 127%, 128%, 129%, 130%, 131%, 132%, 133%, 134%, 135%, 136%, 137%, 138%, 139%, 140%, 141%, 142%, 143%, 144%, 145%, 146%, 147%, 148%, 149%, 150%, 151%, 152%, 153%, 154%, 155%, 156%, 157%, 158%, 159%, 160%, 161%, 162%, 163%, 164%, 165%, 166%, 167%, 168%, 169%, 170%, 171%, 172%, 173%, 174%, 175%, 176%, 177%, 178%, 179%, 180%, 181%, 182%, 183%, 184%, 185%, 186%, 187%, 188%, 189%, 190%, 191%, 192%, 193%, 194%, 195%, 196%, 197%, 198%, 199%, 200%, 201%, 202%, 203%, 204%, 205%, 206%, 207%, 208%, 209%, 210%, 211%, 212%, 213%, 214%, 215%, 216%, 217%, 218%, 219%, 220%, 221%, 222%, 223%, 224%, 225%, 226%, 227%, 228%, 229%, 230%, 231%, 232%, 233%, 234%, 235%, 236%, 237%, 238%, 239%, 240%, 241%, 242%, 243%, 244%, 245%, 246%, 247%, 248%, 249%, 250%, 251%, 252%, 253%, 254%, 255%, 256%, 257%, 258%, 259%, 260%, 261%, 262%, 263%, 264%, 265%, 266%, 267%, 268%, 269%, 270%, 271%, 272%, 273%, 274%, 275%, 276%, 277%, 278%, 279%, 280%, 281%, 282%, 283%, 284%, 285%, 286%, 287%, 288%, 289%, 290%, 291%, 292%, 293%, 294%, 295%, 296%, 297%, 298%, 299%, 300%, 301%, 302%, 303%, 304%, 305%, 306%, 307%, 308%, 309%, 310%, 311%, 312%, 313%, 314%, 315%, 316%, 317%, 318%, 319%, 320%, 321%, 322%, 323%, 324%, 325%, 326%, 327%, 328%, 329%, 330%, 331%, 332%, 333%, 334%, 335%, 336%, 337%, 338%, 339%, 340%, 341%, 342%, 343%, 344%, 345%, 346%, 347%, 348%, 349%, 350%, 351%, 352%, 353%, 354%, 355%, 356%, 357%, 358%, 359%, 360%, 361%, 362%, 363%, 364%, 365%, 366%, 367%, 368%, 369%, 370%, 371%, 372%, 373%, 374%, 375%, 376%, 377%, 378%, 379%, 380%, 381%, 382%, 383%, 384%, 385%, 386%, 387%, 388%, 389%, 390%, 391%, 392%, 393%, 394%, 395%, 396%, 397%, 398%, 399%, 또는 400%일 수 있으며, 400%를 초과하더라도 무방하다. 아울러,

본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질의 시험관내 조건에서의 GLP-1 활성은 상기 백분율 중 임의의 값을 하한선으로 그 보다 큰 다른 값을 상한선으로 한 일정한 범위를 가질 수 있다.

- [72] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 GLP-2 유사체의 시험관내 조건에서의 활성은 야생형 GLP-2 대비 2% 이상일 수 있다.
- [73] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 GLP-2 유사체의 활성은 야생형 GLP-2 대비 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%이거나 또는 50% 이하일 수 있으며, 상기 백분율 중 임의의 값을 하한선으로 그 보다 큰 다른 값을 상한선으로 한 일정한 범위를 가질 수 있다.
- [74] 상기 이중 특이성 융합단백질은 반감기 증가 모이어티가 부가된 것일 수 있고, 상기 반감기 증가 모이어티는 상기 GLP-1 유사체와 GLP-2 유사체 사이에 삽입이 되거나 전체 융합단백질의 N-말단 또는 C-말단에 부가된 것일 수 있으며, 바람직하게는 항체 Fc 영역, PEG, XTEN, PAS(Pro-Ala-Ser), ELP(elastin-like peptide), 글리신-풍부 HAP(homo-amino-acid polymer), GLP(gelatine-like protein), 또는 혈청 알부민일 수 있다.
- [75] 상기 이중 특이성 융합단백질은 체내에서 자연적으로 발현이 되는 GLP-1 및 GLP-2가 중간 펩타이드(intervention peptide)에 의해 연결된 프로글루카곤 또는 그의 유사체가 아니라, GLP-1 유사체 및 GLP-2 유사체가 직접 연결되거나 두 펩타이드가 상기 중간 펩타이드가 아닌 다른 형태의 링커 펩타이드에 의해 연결된 융합단백질일 수 있다.
- [76] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 GLP-1 유사체는 GLP-1, 엑센딘 3(Exendin 3), 엑센딘 4(Exendin 4), GLP-1/Exendin 4 하이브리드 펩타이드, GLP-1-XTEN, Exendin 4-XTEN, Lixisenatide, Albiglutide, Liraglutide, 또는 Taspoglutide 또는 이들 중 어느 하나 이상이 연결된 연속적 반복체일 수 있다. 상기 연속적 반복체는 GLP-1 활성을 증가시키거나 길이를 증가시켜서 이중 특이성 단백질의 생산과 관련된 품질 제어(quality control)을 가능하게 할 수 있고(생산된 단백질이 이형 이량체인지 동형 이량체인지 구분하기 용이함), 기존의 반감기 증가기술로 잘 알려진 PEGylation 대비 제조 공정을 간소화할 수 있기 때문에 생산원가를 절감할 수 있는 이점이 있다. 이러한 GLP-1 유사체의 연속적 반복체의 반복단위수는 요구되는 GLP-1 활성에 따라서 조절될 수 있다.
- [77] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 GLP-1은 서열번호 1 또는 2로 기재되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [78] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 Exendin 3는 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

- [79] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 Exendin 4는 서열번호 4로 기재되는 아미노산 서열로 구성될 수 있다.
- [80] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 GLP-1/Exendin 4 하이브리드는 서열번호 5로 기재되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [81] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 Lixisenatide는 서열번호 6으로 기재되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [82] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 Exendin 4-XTEN은 서열번호 7로 기재되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [83] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 Albiglutide는 서열번호 8로 기재되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [84] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 Liraglutide는 서열번호 9로 기재되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [85] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 Taspoglutide는 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [86] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 GLP-1 연속 반복체는 서열번호 11로 기재되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [87] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 항체 Fc 영역은 이형 이량체화 모이어티가 형성된 항체 Fc 영역일 수 있고, 상기 이량체 모이어티는 Knobs-into-Holes(KiH), KiH_{SS}, HA-TF, ZW1, 7.8.60, DD-KK, EW-RVT, EW-RVT_{SS}, SEED 또는 A107 일 수 있다.
- [88] 본 문서에서 사용되는 용어 "Knobs-into-Holes(KiH)"는 Fc 영역을 포함하는 제조합 단백질 또는 IgG 항체의 생산에 있어서, 중쇄의 이형 이량체화(heterodimerization)를 위해 사용되는 항체 공학에 있어서의 하나의 고안 전략을 의미한다. 상기 KiH 기술은 이형 이량체를 형성하는 두 융합단백질을 제1융합단백질 및 제2융합단백질로 구분할 경우, 상기 제1융합단백질의 제1변형 Fc 영역 중 CH3 도메인의 22번째 아미노산인 트레오닌(T)이 트립토판(W)으로 치환된 것(T366W)일 수 있고(Knob), 상기 제2융합단백질은 제2변형 Fc 영역 중 CH3 도메인의 22번째 아미노산인 트레오닌(T)이 세린(S)으로(T366S), 24번째 아미노산인 류신(L)이 알라닌(A)으로(L368A), 63번째 아미노산인 타이로신(Y)이 발린(V)으로 치환된 것(Y407V)일 수 있고(Hole 구조), 반대로 상기 제1융합단백질은 제1변형 Fc 영역 중 CH3 도메인의 22번째 아미노산인 트레오닌(T)이 세린(S)으로(T366S), 24번째 아미노산인 류신(L)이 알라닌(A)으로(L368A), 62번째 아미노산인 타이로신(T)이 발린(V)으로 치환된 것(Y407V)일 수 있고(Hole 구조), 상기 제2융합단백질은 제2변형 Fc 영역 중 CH3 도메인의 22번째 아미노산인 트레오닌(T)이 트립토판(W)으로 치환된 것(T366W)일 수 있다(Knob 구조).
- [89] 이때, 상기 변이가 일어난 아미노산의 위치는 UniProt No. P01857의 인간 IgG1의 아미노산 서열 중 CH3 영역에 해당되는 위치 224-330(서열번호 61)을 기준으로 하였으며, 괄호안의 구체적인 아미노산 치환과 관련된 숫자는 항체의 아미노

산 서열과 관련된 EU numbering 규칙에 따른 것이다. 만일 상기 CH3 도메인 상에 Knobs-into-Holes 구조와 무관한 부위에서 아미노산의 부가, 결실 또는 치환 등의 추가적인 변이가 발생한 경우라도 상기 기준서열을 기준으로 하여 해당 위치에 상응하는 아미노산이 변이된 것을 사용하면 된다. 선택적으로, 상기 Knobs-into-Holes 구조는 당업계에 잘 알려진 다른 아미노산 변이를 통해 도입될 수 있다. 이러한 변이는 선행문헌(Wei *et al.*, *Oncotarget* 8(31): 51037-51049, 2017; Ridgway *et al.*, *Protein Eng.* 9(7): 617-621, 1996; Carter, P., *J. Immunol. Methods* 48(1-2): 7-15, 2001)에 잘 기술되어 있다. 이러한 선택적인 변이로는 예컨대 제1융합단백질의 CH3 도메인의 22번째 아미노산인 트레오닌(T)이 타이로신(Y)으로 치환된 (T366Y) Knob 구조 및 제2융합단백질의 CH3 도메인의 63번째 아미노산인 타이로신(Y)이 트레오닌(T)으로 치환된 (Y403T) Hole 구조의 조합을 통해 이중 특이성 이량체 융합단백질이 생성될 수 있다. 상기 Knobs-into-Holes 구조는 반대로 상기 제1융합단백질에 Hole 구조가 도입되고, 상기 제2융합단백질에 Knob 구조가 도입되어 형성될 수 있다.

- [90] 본 문서에서 사용되는 용어 "KiH_{ss}"는 상기 KiH 구조에서 분자간 이황화결합 (intramolecular)이 형성될 수 있도록 CH3 내에 시스테인을 도입한 구조로서 상기 KiH 구조에서 Knob Fc의 CH3의 10번째 아미노산인 세린(S)을 시스테인(C)으로 추가적으로 치환하고(S354C) Hole Fc의 5번째 아미노산인 타이로신(Y)을 시스테인(C)으로 추가적으로 치환한 것(Y349C)일 수 있다(Merchant *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 16(7): 677-681, 1998).
- [91] 본 문서에서 사용되는 용어 "HA-TF"는 제1변형 Fc 영역의 CH3의 20번째 아미노산인 세린(S)을 히스티딘(H)으로(S364H), 61번째 아미노산인 페닐알라닌(F)을 알라닌(A)으로(F405A)로 치환하고, 제2변형 Fc 영역의 CH3의 5번째 아미노산인 타이로신(Y)을 트레오닌(T)으로(Y349T), 50번째 아미노산인 트레오닌(T)을 페닐알라닌(F)으로(T394F) 치환함으로써 소수성/입체 상보성(hydrophobic/steric complementarity)을 이용하여 이형 이량체화를 유도하는 기술을 의미한다(Moore *et al.*, *MAbs* 3(6): 546-557, 2011).
- [92] 본 문서에서 사용되는 용어 "ZW1"은 제1변형 Fc 영역의 CH3의 6번째 아미노산인 트레오닌(T)을 발린(V)으로(T350V), 7번째 아미노산인 류신(L)을 타이로신(Y)으로(L351Y), 61번째 아미노산인 페닐알라닌(F)을 알라닌(A)으로(F405A) 치환하고, 63번째 아미노산인 타이로신(Y)을 발린(V)으로(Y407V)로 치환하고, 제2변형 Fc 영역의 CH3의 Fc 영역의 CH3의 6번째 아미노산인 트레오닌(T)을 발린(V)으로(T350V), 22번째 아미노산인 트레오닌(T)을 트립토판(W)으로(T366W), 48번째 아미노산인 라이신(K)을 류신(L)으로(K392L), 50번째 아미노산인 트레오닌(T)을 트립토판(W)으로(T394W) 치환함으로써 소수성/입체 상보성(hydrophobic/steric complementarity)을 이용하여 이형 이량체화를 유도하는 기술을 의미한다(von Kreudenstein *et al.*, *MAbs* 5(5): 646-654, 2013).

- [93] 본 문서에서 사용되는 용어 "7.8.60"은 제1변형 Fc 영역의 CH3의 16번째 아미노산인 라이신(K)을 아스파르트산(D)으로(K360D), 55번째 아미노산인 아스파르트산(D)을 메티오닌(M)으로(D399M), 63번째 아미노산인 타이로신(Y)을 발린(V)으로(Y407V)로 치환하고, 제2변형 Fc 영역의 CH3의 Fc 영역의 1번째 아미노산인 글루탐산(E)을 아르기닌(R)으로(E345R), 3번째 아미노산인 글루타민(Q)을 아르기닌(R)으로(Q347R), 22번째 아미노산인 트레오닌(T)을 발린(V)으로(T366V), 63번째 아미노산인 라이신(K)을 발린(V)으로(K409V) 치환함으로써 소수성/입체 상보성(hydrophobic/steric complementarity) 및 정전기적 상보성(electrostatic complementarity)을 이용하여 이형 이량체화를 유도하는 기술을 의미한다(Leaver-Fay *et al.*, *Structure* 24(4): 641-651, 2016).
- [94] 본 문서에서 사용되는 용어 "DD-KK"는 제1변형 Fc 영역의 CH3의 65번째 아미노산인 라이신(K)을 아스파르트산(D)으로(K409D), 48번째 아미노산인 라이신(K)을 아스파르트산(D)으로(K392D) 치환하고, 제2변형 Fc 영역의 CH3의 55번째 아미노산인 아스파르트산(D)을 라이신(K)으로(D399K), 13번째 아미노산인 글루탐산(E)을 라이신(K)으로(E356K) 치환함으로써 정전기적 상보성(electrostatic complementarity)을 이용하여 이형 이량체화를 유도하는 기술을 의미한다(Gunasekaran *et al.*, *J. Biol. Chem.* 285(25): 19637-19646, 2010).
- [95] 본 문서에서 사용되는 용어 "EW-RVT"는 제1변형 Fc 영역의 CH3의 16번째 아미노산인 라이신(K)을 글루탐산(E)으로(K360E), 65번째 아미노산인 라이신(K)을 트립토판(W)으로(K409W) 치환하고, 제2변형 Fc 영역의 CH3의 Fc 영역의 CH3의 3번째 아미노산인 글루타민(Q)을 아르기닌(R)으로(Q347R), 55번째 아미노산인 아스파르트산(D)을 발린(V)으로(D399V), 61번째 아미노산인 페닐알라닌(F)을 트레오닌(T)으로(F405T) 치환함으로써 소수성/입체 상보성(hydrophobic/steric complementarity) 및 장거리 정전기적 상호작용(long-range electrostatic interaction)을 이용하여 이형 이량체화를 유도하는 기술을 의미한다(Choi *et al.*, *Mol. Cancer Ther.* 12(12): 2748-2759, 2013).
- [96] 본 문서에서 사용되는 용어 "EW-RVT_{ss}"는 상기 EW-RVT 구조에서 분자간 이황화결합(intramolecular)이 형성될 수 있도록 CH3 내에 시스테인을 도입한 구조로서 상기 EW-RVT의 제1변형 Fc 영역의 CH3의 5번째 아미노산인 타이로신(Y)을 시스테인(C)으로 추가적으로 치환하고(Y349C), 제2변형 Fc 영역의 CH3의 10번째 아미노산인 세린(S)을 시스테인(C)으로 추가적으로 치환한(S354C) 것을 의미한다(Choi *et al.*, *Mol. Immunol.* 65(2): 377-383, 2015).
- [97] 본 문서에서 사용되는 용어 "SEED"는 제1변형 Fc 영역의 CH3에 IgA-유래 45 잔기를 도입하고, 제2변형 Fc 영역의 CH3에 IgG1-유래의 57 잔기를 도입함으로써 IgG 및 IgA 사이의 사슬 교환에 따른 소수성/입체 상보성(hydrophobic/steric complementarity)을 이용하여 이형 이량체화를 유도하는 기술을 의미한다(Davis *et al.*, *Protein Eng, Des, Sel*, 23(4): 195-202, 2010).

- [98] 본 문서에서 사용되는 용어 "A107"은 제1변형 Fc 영역의 CH3의 26번째 아미노산인 라이신(K)을 글루탐산(E)으로(K370E), 69번째 아미노산인 라이신(K)을 트립토판(W)으로(K409W)으로 치환하고, 제2변형 Fc 영역의 CH3의 13번째 아미노산인 글루탐산(E)를 아스파라긴(N)으로(E357N), 55번째 아미노산인 아스파르트산(D)을 발린(V)으로(D399V), 61번째 아미노산인 페닐알라닌(F)을 트레오닌(T)으로 치환함으로써(F405T), 소수성/입체 상보성(hydrophobic/steric complementarity) 및 수소결합 상보성(hydrogen bonding complementarity)을 이용하여 이형 이량체화를 유도하는 기술을 의미한다(Choi *et al.*, *PLoS One* 10(12): e0145349, 2015).
- [99] 상기 하이브리드 항체 Fc 영역은 서열번호 12 내지 16으로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다. 아울러, 상기 하이브리드 항체 Fc 영역은 ADCC(antibody-dependent cell cytotoxicity)나 CDC(complement-dependent cytotoxicity)와 같은 체내 투여 시 원하지 않은 부작용을 유발하지 않도록 추가적으로 변이된 것일 수 있다. 이러한 하이브리드 항체 Fc 영역은 대한민국 특허 제897938호에 기재된 것일 수 있고, 서열번호 14로 기재되는 아미노산 서열로 구성이 되는 하이브리드 Fc 영역(Knob 구조)의 18번째 아미노산인 트레오닌(T)이 글루타민(Q)으로 치환되고, 196번째 아미노산인 메티오닌(M)이 류신(L)으로 치환된 서열번호 15로 기재되는 하이브리드 Fc 영역 변이체(NTIG Knob) 또는 서열번호 13로 기재되는 아미노산 서열로 구성이 되는 하이브리드 Fc 영역(Hole)의 18번째 아미노산인 트레오닌(T)이 글루타민(Q)으로 치환되고, 196번째 아미노산인 메티오닌(M)이 류신(L)으로 치환된 서열번호 16으로 기재되는 아미노산 서열로 구성이 되는 하이브리드 Fc 영역 변이체(NTIG Hole)일 수 있다.
- [100] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 GLP-2 유사체는 GLP-2, GLP-2^{A2G} 변이체, GLP-2^{N16G_L17Q} 변이체, GLP-2^{A2G_N16G_L17Q} 변이체, Glepaglutilde, 또는 GLP-2 analogue 10일 수 있는데, 야생 GLP-2 활성 대비 낮은 활성을 달성하기 위해 GLP-2 수용체와의 결합 친화도를 떨어뜨릴 목적으로 아미노산 치환, 부가, 결실 등의 변이가 도입될 수 있다. 선택적으로는 야생형 GLP-2를 사용할 경우 GLP-1 유사체 대비 길이를 짧게 함으로써(예컨대, GLP-1 유사체와 Fc 영역 사이에 좀 더 긴 길이의 링커 펩타이드를 삽입함으로써), GLP-2 수용체에 대한 결합 친화도를 낮추는 접근 방법을 사용할 수 있다. 이 경우, 제1융합단백질의 링커의 길이는 제2융합단백질의 링커보다 5 내지 40 a.a. 정도 더 길 수 있고, 더 구체적으로는 5 a.a., 6 a.a., 7 a.a., 8 a.a., 9 a.a., 10 a.a., 11 a.a., 12 a.a., 13 a.a., 14 a.a., 15 a.a., 16 a.a., 17 a.a., 18 a.a., 19 a.a., 20 a.a., 21 a.a., 22 a.a., 23 a.a., 24 a.a., 25 a.a., 26 a.a., 27 a.a., 28 a.a., 29 a.a., 30 a.a., 31 a.a., 32 a.a., 33 a.a., 34 a.a., 35 a.a., 36 a.a., 37 a.a., 38 a.a., 39 a.a., 또는 40 a.a. 정도 길 수 있으며, 상기 아미노산 길이 중 임의의 값을 하한선으로 그 보다 큰 다른 값을 상한선으로 한 일정한 범위를 가질 수 있다. 실제, 본 발명자들은 본 발명의 실시예 2 내지 4를 통해 GLP-1 유사체의 길이를

GLP-2 유사체 대비 길게 고안할 경우(좀 더 긴 글리칸 링커 펩타이드를 사용하거나 GLP-1 연속 반복체를 형성함으로써), GLP-2 유사체에 돌연변이가 도입되거나 도입되지 않은 경우 모두 GLP-2 상대 활성이 매우 낮아지는 현상을 확인하였다. 반대로 GLP-2 유사체에 글리칸 링커를 도입함으로써 GLP-2 유사체 포함 융합단백질의 길이가 GLP-1 유사체 포함 융합단백질 대비 더 길어질 경우 GLP-2 유사체의 상대 활성이 대폭 증가함을 확인할 수 있었다.

- [101] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 GLP-2 유사체는 서열번호 17 내지 22 중 어느 하나로 기재되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 서열번호 18로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드는 인간 GLP-2 야생형 펩타이드이고, 서열번호 17로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 인간 GLP-2 변이체는 2번째 아미노산인 알라닌이 글라이신으로 치환된 것(A2G mutant or GLP-2^{A2G}, 이하, 편의상 'GLP-2-2G'로 지칭됨)으로서 Teduglutide로도 불린다. 한편, 서열번호 19로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 GLP-2 변이체는 2번째 아미노산인 알라닌(A)이 글라이신(G)으로 변이되었을 뿐만 아니라 16번째 아미노산인 아스파라긴(N)이 글라이신(G)으로 변이되고 17번째 아미노산인 류신(L)이 글루타민(Q)으로 변이가 된 GLP-2 변이체(GLP-2^{A2G,N16G,L17Q})로서 GLP-2로서의 기능은 그대로 유지하면서도 재조합 생산 시 GLP-2의 이량체화나 그로 인한 응집체 형성을 억제하는 것으로 알려지고 있다(Baker *et al.*, *J. Mol. Recognit.* 25: 155-164, 2012). 선택적으로 GLP-2 야생형 펩타이드에서 2번째 아미노산인 알라닌이 글라이신으로 치환되고 17번째 아미노산인 류신이 글루타민으로 치환된 것(A2G, L17Q, 서열번호 20)도 상기 서열번호 19로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 GLP-2 유사체와 동등한 기능을 발휘할 수 있으므로, 본 발명에서 GLP-2 유사체로 사용하는 것이 가능하다.
- [102] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 Glepaglutide는 서열번호 21로 기재되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [103] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 GLP-2 analogue 10는 서열번호 22로 기재되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [104] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 제1융합단백질은 서열번호 23 내지 25로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [105] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 제2융합단백질은 서열번호 26 내지 28로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [106] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 제1융합단백질은 하이브리드 Fc 영역 중 CH3 도메인의 10번째 아미노산인 세린이 시스테인(C)으로 치환되고, 22번째 아미노산인 트레오닌(T)이 트립토판(W)으로 치환된 것(Knob 구조)일 수 있고, 제2융합단백질은 Fc 영역 중 CH3 도메인의 5번째 아미노산인 타이로신(Y)이 시스테인(C)로, 22번째 아미노산인 트레오닌이 세린(S)으로, 24번째 아미노산인 류신(L)이 알라닌(A)으로, 63번째 아미노산인 타이로신(Y)이 발린(V)로 치환된

것(Hole 구조)일 수 있고, 반대로 상기 제1융합단백질은 Fc 영역 중 CH3 도메인의 5번째 아미노산인 타이로신(Y)이 시스테인(C)로, 22번째 아미노산인 트레오닌이 세린(S)로, 24번째 아미노산인 류신(L)이 알라닌(A)로, 63번째 아미노산인 타이로신(Y)이 발린(V)로 치환된 것(Hole 구조)일 수 있고, 상기 제2융합단백질은 하이브리드 Fc 영역 중 CH3 도메인의 10번째 아미노산인 세린이 시스테인(C)으로 치환되고, 22번째 아미노산인 트레오닌(T)이 트립토판(W)으로 치환된 것(Knob 구조)일 수 있다.

- [107] 선택적으로, 상기 제1융합단백질은 하이브리드 Fc 영역 중 CH3 도메인의 22번째 아미노산인 트레오닌(T)가 타이로신(Y)로 치환되고, 상기 제2융합단백질은 하이브리드 Fc 영역 중 CH3 도메인의 63번째 아미노산인 타이로신(Y)이 트레오닌(T)로 치환된 것이고, 상기 제2융합단백질은 하이브리드 Fc 영역 중 CH3 도메인의 63번째 아미노산인 타이로신(Y)이 트레오닌(T)로 치환된 것이고, 상기 제1융합단백질은 하이브리드 Fc 영역 중 CH3 도메인의 63번째 아미노산인 타이로신(Y)이 트레오닌(T)로 치환된 것일 수 있다. 다만 상기 63번째 아미노산의 변이는 서열번호 61로 기재되는 인간 IgG1의 CH3 도메인의 아미노산 서열이 기준이 아니라 IMGT(international ImMunoGeneTics information system)의 numbering 규칙에 따르면(Lefranc *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.*, 27: 55-77, 2003), Y86T로 표시될 수 있다. 상기 KiH 구조 외에 항체 Fc 영역에 도입되어 이형 이량체 형성을 가능케 하는 상술한 바와 같은 다양한 이형 이량체 형성 모이어티 역시 사용이 가능하다.
- [108] 상기 이종 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 융합단백질의 융합파트너들 사이, 즉 펩타이드 또는 도메인 사이에는 하나 이상의 링커 펩타이드가 삽입될 수 있다. 즉, 상기 GLP-1 유사체 및 GLP-2 유사체가 융합된 이종 특이성 융합단백질의 경우 GLP-1 유사체 및 GLP-2 유사체 사이에 링커 펩타이드가 삽입될 수 있고, 상기 제1융합단백질 및 제2융합단백질의 이량체화에 의해 생성되는 이종 특이성 융합단백질의 경우 제1융합단백질 내부의 GLP-1 유사체와 항체 Fc 영역 사이에 링커 펩타이드가 삽입될 수 있고, 마찬가지로 제2융합단백질 내의 GLP-2 유사체와 항체 Fc 영역 사이에 링커 펩타이드가 삽입될 수 있다. 이 때, 상기 링커 펩타이드는 N-글리칸 부착 부위를 포함하거나 포함하지 않는 것일 수 있다. 상기 N-글리칸 부착 부위는 제1융합단백질과 제2융합단백질의 크기를 다르게 함으로써 이형 이량체 형성을 보다 용이하게 확인할 수 있도록 하기 위함이며, GLP-1R이나 GLP-2R에 대한 결합 친화도에 있어서는 큰 영향은 없는 것으로 확인이 되었다.
- [109] 상기 링커 펩타이드는 EPKSSDKTHTCPPCP(서열번호 29), EPKSCDKTHTCPPCP(서열번호 30), GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCP(서열번호 31), GGGGSGGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCP(서열번호 32), AKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECP(서열

번호 33), GGGGSGGGGSGGGGSEKEKEEQEERTHTCPPCP(서열
 번호 34), GGGGSGGGGSGGGGSAKNTTAPATTRNTRGGEEKK
 KEKEKEEQEERTHTCPPCP(서열번호 35), AAGSGGGGSGGGGSGGGGS(서
 열번호 36), GGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 37), GGS GG(서열번호 38),
 GGS GGSGGS(서열번호 39), GGS GG(서열번호 40), $(G_4S)_n$ (단위체: 서열
 번호 41, n 은 1 내지 10의 정수), $(GGS)_n$ (n 은 1 내지 10의 정수), $(GS)_n$ (n 은 1
 내지 10의 정수), $(GSSGGS)_n$ (단위체: 서열번호 42, n 은 1 내지 10의 정수),
 KESGSVSSEQLAQFRSLD(서열번호 43), EGKSSGSGSESKST(서열번호 44),
 GSAGSAAGSGEF(서열번호 45), $(EAAAK)_n$ (단위체: 서열번호 46, n 은 1 내
 지 10의 정수), CRRRRRREAEAC(서열번호 47), $A(EAAAK)_4$ ALEA(EAAAK)
 $_4$ A(서열번호 48), GGGGGGGG(서열번호 49), GGGGGG(서열번호 50),
 AEAAAKEAAAAKA(서열번호 51), PAPAP(서열번호 52), $(Ala-Pro)_n$ (n 은 1 내
 지 10의 정수), VSQTSKLTRAETVFPDV(서열번호 53, PLGLWA(서열번호 54),
 TRHRQPRGWE(서열번호 55), AGNRVRRSVG(서열번호 56), RRRRRRRR(서
 열번호 57), GFLG(서열번호 58), GSSGSGSGSGSGGGDEADGSRGS
 QKAGVDE(서열번호 59), 또는 GSTSGSGKPGSGEGS(서열번호 60)일 수 있다.

- [110] 본 발명의 일 관점에 따르면, 상기 이중 특이성 융합단백질을 포함하는 조성물
 이 제공된다.
- [111] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면 상기 중 어느 하나 이상의 이중 특이성 융합단
 백질을 유효성분으로 포함하는, 대사성 질환 치료용 약학적 조성물이 제공된다.
- [112] 상기 약학적 조성물에 있어서, 상기 대사성 질환은 대사증후군, 비만, 당뇨병,
 대사이상연관 지방간 질환, 대사이상연관 지방간염, 간섬유증 또는 간경화일 수
 있고, 상기 당뇨병은 제1형 당뇨병 또는 제2형 당뇨병일 수 있으며, 상기 간섬유
 증은 만성 대사이상연관 지방간염의 진행에 의해 발생한 간 섬유증일 수 있다.
- [113] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 대사성 질환의 치료에 사용되는 상기 중 어느
 하나의 이중 특이성 융합단백질이 제공된다.
- [114] 상기 이중 특이성 융합단백질에 있어서, 상기 대사성 질환은 대사증후군, 비만,
 당뇨병, 대사이상연관 지방간 질환, 대사이상연관 지방간염, 간섬유증 또는 간경
 화일 수 있고, 상기 당뇨병은 제1형 당뇨병 또는 제2형 당뇨병일 수 있으며, 상기
 간섬유증은 만성 대사이상연관 지방간염의 진행에 의해 발생한 간 섬유증일 수
 있다.
- [115] 본 발명의 다른 일관점에 따르면, 대사성 질환 치료제의 제조에 있어서, 상기 중
 어느 하나의 이중 특이성 융합단백질의 용도가 제공된다.
- [116] 상기 용도에 있어서, 상기 대사성 질환은 대사증후군, 비만, 당뇨병, 대사이상
 연관 지방간 질환, 대사이상연관 지방간염, 간섬유증 또는 간경화일 수 있고, 상
 기 당뇨병은 제1형 당뇨병 또는 제2형 당뇨병일 수 있으며, 상기 간섬유증은 만
 성 대사이상연관 지방간염의 진행에 의해 발생한 간 섬유증일 수 있다.

- [117] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 치료적으로 유효한 양의 상기 이중 특이성 융합단백질을 대사성 질환에 걸린 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 상기 개체의 대사성 질환의 치료방법이 제공된다.
- [118] 상기 치료방법에 있어서, 상기 대사성 질환은 대사증후군, 비만, 당뇨병, 대사이상 연관 지방간 질환, 대사이상 연관 지방간염, 간섬유증 또는 간경화일 수 있고, 상기 당뇨병은 제1형 당뇨병 또는 제2형 당뇨병일 수 있으며, 상기 간섬유증은 만성 대사이상 연관 지방간염의 진행에 의해 발생한 간 섬유증일 수 있다.
- [119] GLP-1 수용체 작용제 중 하나인 Exendin 4는 이미 임상시험에서 제2형 당뇨병 환자의 혈당조절 및 체중 조절에 효과가 있음이 증명된 바(DeFronzo *et al.*, *Diabetes Care* 28: 1092-1100, 2005), 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 이중 특이성 융합단백질은 비만, 당뇨병은 물론 대사증후군 등의 대사성 질환의 치료에 사용될 수 있다.
- [120] 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있고, 상기 담체 외에 약학적으로 허용가능한 보조제, 부형제 또는 희석제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [121] 본 문서에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용가능한"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [122] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 약학적 조성물은 포유동물에 투여 시, 활성 성분의 신속한 방출, 또는 지속 또는 지연된 방출이 가능하도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사용액, 멸균 분말 형태를 포함한다.
- [123] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물은 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 예를 들면, 경구, 비경구, 예를 들면 좌제, 경피, 정맥, 복강, 근육내, 병변내, 비강, 척추관 내 투여로 투여될 수 있으며, 또한 서방형 또는 연속적 또는 반복적 방출을 위한 이식장치를 사용하여 투여될 수 있다. 투여횟수는 원하는 범위 내에서 하루에 1회, 또는 수회로 나누어 투여할 수 있으며, 투여 기간도 특별히 한정되지 않는다.
- [124] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물은 일반적으로 사용되는 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코오스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같

은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 또한 본 발명에 따른 조성물은 그 투여방법이나 제형에 따라 필요한 경우, 현탁제, 용해보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성화제, 희석제, 부형제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 산화방지제 등을 적절히 포함할 수 있다. 상기에 예시된 것들을 비롯하여 본 발명에 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 최신판]에 상세히 기재되어 있다.

- [125] 상기 조성물의 환자에 대한 투여량은 환자의 신장, 체표면적, 연령, 투여되는 특정 화합물, 성별, 투여 시간 및 경로, 일반적인 건강, 및 동시에 투여되는 다른 약물들을 포함하는 많은 요소들에 따라 다르다. 약학적으로 활성인 단백질은 100 ng/체중(kg) - 10 mg/체중(kg)의 양으로 투여될 수 있고, 더 바람직하게는 1 내지 500 μ g/kg(체중)으로 투여될 수 있으며, 가장 바람직하게는 5 내지 50 μ g/kg(체중)으로 투여될 수 있는데, 상기 요소들을 고려하여 투여량이 조절될 수 있다.
- [126] 본 문서에서 사용되는 용어 "치료적으로 유효한 양(therapeutically effective amount)"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 0.1 mg/kg 내지 1 g/kg, 더 바람직하게는 1 mg/kg 내지 500 mg/kg일 수 있으나, 유효 투여량은 환자의 나이, 성별 및 상태에 따라 적절히 조절될 수 있다.
- [127] 상기 둘 이상의 단백질 또는 도메인 사이에는 통상적으로 유연한 구조를 갖는 링커 펩타이드(linker peptide)가 삽입될 수 있다. 상기 링커 펩타이드는 EPKSSDKTHTCPPCP(서열번호 29), EPKSCDKTHTCPPCP(서열번호 30), GGGSGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCP(서열번호 31), GGGSGGGSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCP(서열번호 32), AKATTAPATTRNTGRGGEKKKEKEKEEQEERETKTPECP(서열번호 33), GGGSGGGSGGGGSEKEKEEQEERTHTTCPPCP(서열번호 34), GGGSGGGSGGGGSAKNTTAPATTRNTTRGGEKKKEKEEQEERTHTTCPPCP(서열번호 35), AAGSGGGSGGGSGGGSGGGGS(서열번호 36), GGGSGGGSGGGGS(서열번호 37), GSGSG(서열번호 38), GSGSGSGS(서열번호 39), GGGSGG(서열번호 40), (G₄S)_n(단위체: 서열번호 41, n은 1 내지 10의 정수), (GGG)_n(n은 1 내지 10의 정수), (GS)_n(n은 1 내지 10의 정수), (GSSGS)_n(단위체: 서열번호 42, n은 1 내지 10의 정수), KESGSVSSEQLAQFRSLD(서열번호 43), EGKSSGSGSESKST(서열번호 44), GSAGSAAGSGEF(서열번호 45), (EAAAK)_n(단위체: 서열번호 46, n은 1 내지 10의 정수), CRRRRRREAEAC(서열번호 47), A(EAAAK)₄ALEA(EAAAK)

4A(서열번호 48), GGGGGGGG(서열번호 49), GGGGGG(서열번호 50), AEAAAKEAAAAKA(서열번호 51), PAPAP(서열번호 52), (Ala-Pro)_n(_n은 1 내지 10의 정수), VSQTSKLTRAETVFPDV(서열번호 53, PLGLWA(서열번호 54), TRHRQPRGWE(서열번호 55), AGNRVRRSVG(서열번호 56), RRRRRRRR(서열번호 57), GFLG(서열번호 58), GSSGGSGSSGGSGGGDEADGSRGS QKAGVDE(서열번호 59), 또는 GSTSGSGKPGSGEGS(서열번호 60) 등이 포함될 수 있다.

- [128] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 이중 특이성 융합단백질은 상기 제1융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제1유전자 컨스트럭트 및 상기 제2융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제2유전자 컨스트럭트를 포함하는 재조합 발현백터를 숙주세포에 형질도입한 후 재조합 방식으로 발현함으로써 생산이 가능하다.
- [129] 이 경우, 상기 제1유전자 컨스트럭트 및 제2유전자 컨스트럭트는 하나의 발현백터에 삽입되어 발현되거나, 두 개의 개별적인 발현백터에 삽입되어 발현이 될 수 있다. 전자의 경우 두 개의 별개의 조절서열에 각각의 유전자 컨스트럭트가 작동가능하게 연결되도록 백터를 고안하거나 두 유전자 컨스트럭트가 하나의 조절서열에 작동가능하게 연결이 되고, 양 유전자 컨스트럭트를 내부 리보솜 진입 부위(internal ribosome entry site, IRES)가 연결하는 방식을 사용할 수 있다.
- [130] 본 문서에서 사용되는 용어 "작동 가능하게 연결된(operably linked to)"이란 목적으로 하는 핵산서열(예컨대, 시험관내 전사/번역 시스템에서 또는 숙주세포에서)이 그의 발현이 이루어질 수 있도록 하는 방식으로 상기 조절서열에 연결되어 있다는 것을 의미한다.
- [131] 상기 "조절서열"이란 용어는 프로모터, 인핸서 및 다른 조절 요소(예, 폴리아데닐화 신호)를 포함하는 의미이다. 조절서열에는 많은 숙주세포에서 목적으로 하는 핵산이 항상적으로 발현될 수 있도록 지시하는 것, 특정한 조직세포에서만 목적으로 하는 핵산이 발현될 수 있도록 지시하는 것(예, 조직특이적 조절서열), 그리고 특정 신호에 의해 발현이 유도되도록 지시하는 것(예, 유도성 조절서열)이 포함된다. 발현백터의 설계는 형질전환될 숙주세포의 선택 및 원하는 단백질 발현의 수준 등과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다는 것은 당업자라면 이해할 수 있다. 본 발명의 발현백터는 숙주 세포에 도입되어 상기 융합 단백질을 발현할 수 있다. 상기 진핵세포 및 원핵세포에서 발현을 가능하게 하는 조절서열들은 당업자에게 잘 알려져 있다. 상술한 바와 같이, 이들은 보통 전사개시를 담당하는 조절서열들 및, 선택적으로 전사물의 전사종결 및 안정화를 담당하는 폴리-A 신호를 포함한다. 추가적인 조절서열들은 전사조절인자 외에도 번역증진인자 및/또는 천연-조합 또는 이중성 프로모터 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어 포유류 숙주 세포에서 발현을 가능하게 하는 가능한 조절서열들은 CMV-HSV 티미딘 키나아제 프로모터, SV40, RSV-프로모터(로우스 육종 바이러스), 인간 신장 요소 1 α -프로모터, 글루코코르티코이드-유도성 MMTV-프로모터(물

로니 마우스 종양 바이러스), 메탈로티오네인-유도성 또는 테트라사이클린-유도성 프로모터 또는, CMV 증폭제 또는 SV40-증폭제와 같은 증폭제를 포함한다. 신경 세포 내 발현을 위해, 신경미세섬유-프로모터(neurofilament-promoter), PGDF-프로모터, NSE-프로모터, PrP-프로모터 또는 thy-1-프로모터들이 사용될 수 있다는 것이 고려되고 있다. 상기 프로모터들은 당 분야에 알려져 있으며, 문헌(Charron, *J. Biol. Chem.* 270: 25739-25745, 1995)에 기술되어 있다. 원핵세포 내 발현을 위해, lac-프로모터, tac-프로모터 또는 trp 프로모터를 포함하는 다수의 프로모터들이 개시되어 있다. 전사를 개시할 수 있는 인자들 외에, 상기 조절서열들은 본 발명의 일 실시예에 따른 폴리뉴클레오타이드의 하류(downstream)에 SV40-폴리-A 부위 또는 TK-폴리-A 부위와 같은 전사 종결 신호를 포함할 수도 있다. 본 문서에서, 적당한 발현 벡터들은 당 분야에 알려져 있으며, 그 예로는 오카야마-베르그(Okayama-Berg) cDNA 발현 벡터 pcDV1(Pharmacia), pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3(Invitrogen), pSPORT1(GIBCO BRL), pGX-27(특허 제1442254호), pX(Pagano *et al.*, *Science* 255: 1144-1147, 1992), 효모 2-혼성(two-hybrid) 벡터, 가령 pEG202 및 dpJG4-5(Gyuris *et al.*, *Cell* 75: 791-803, 1995) 또는 원핵 발현벡터, 가령 람다 gt11 또는 pGEX(Amersham Pharmacia)가 있다. 본 발명의 핵산 분자들 외에, 벡터는 분비 신호를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함할 수 있다. 상기 분비신호들은 당업자에게 잘 알려져 있다. 그리고, 사용된 발현 시스템에 따라, 융합단백질을 세포 구획으로 이끌 수 있는 리더서열(leader sequence)이 본 발명의 일 실시예에 따른 폴리뉴클레오타이드의 코딩 서열에 조합되며, 바람직하게는 해독된 단백질 또는 이의 단백질을 세포질 주변 또는 세포의 매질로 직접 분비할 수 있는 리더 서열이다.

[132] 또한, 본 발명의 벡터는 예를 들면, 표준 재조합 DNA 기술에 의하여 제조될 수 있으며, 표준 재조합 DNA 기술에는 예를 들면, 평활말단 및 접착말단 라이게이션, 적절한 말단을 제공하기 위한 제한 효소 처리, 부적합한 결합을 방지하기 위하여 알칼리성 포스파테이즈 처리에 의한 인산기 제거 및 T4 DNA 라이게이즈에 의한 효소적 연결 등이 포함된다. 화학적 합성 또는 유전자 재조합 기술에 의하여 얻어진 신호 펩타이드를 코딩하는 DNA, 본 발명의 이중 특이성 융합단백질을 암호화하는 DNA를 적절한 조절서열이 포함되어 있는 벡터에 재조합함으로써 본 발명의 벡터가 제조될 수 있다. 상기 조절 서열이 포함되어 있는 벡터는 상업적으로 구입 또는 제조할 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 pBispecific backbone vector(Genexine, Inc., 대한민국)또는 pAD15 vector를 골격 벡터로 사용하였다.

[133] 상기 발현벡터는 분비 신호서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 분비 신호서열은 세포내에서 발현되는 재조합 단백질의 세포 밖으로의 분비를 유도하며, tPA(tissue plasminogen activator) 신호서열, HSV gDs(단순포진 바이러스 당단백질 Ds) 신호서열 또는 성장호르몬 신호서열일 수 있다.

- [134] 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 발현백터는 숙주세포에서 상기 단백질을 발현하도록 할 수 있는 발현백터일 수 있으며, 상기 발현백터는 플라스미드 백터, 바이러스 백터, 코스미드 백터, 파지미드 백터, 인공 인간 염색체 등 그 어떠한 형태를 나타내더라도 무방하다.

발명의 실시를 위한 형태

- [135] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속한 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

- [136] **실시예: 이중 특이성 융합단백질의 고안**

- [137] 본 발명자들은 GLP-1 유사체 및 GLP-2 유사체를 모두 포함하는 다양한 이중 특이성 융합단백질을 하기 도 1 및 표 1과 같이 고안하였다.

- [138] GLP-1 유사체 및 GLP-2 유사체를 포함하는 이중 특이성 융합단백질을 고안하는데 있어서, GLP-1 유사체 및 GLP-2 유사체의 활성의 조절을 위해 GLP-1/Exendin 4 hybrid(이하, 편의상 'GLP-1/Ex4 Hyb'로 약칭함) 및 이들의 연속 반복체 및 GLP-2 유사체(GLP-2-2G, 및 16번 및 17번 위치 돌연변이체(GLP-2-2G mutant))를 사용하였고 정제 용이성을 위해 GLP-1 유사체를 포함하는 제1융합단백질 및 GLP-2 유사체를 포함하는 제2융합단백질 중 어느 하나에 글리칸 링커를 사용하거나 둘 모두 글리칸 링커를 사용하지 않았다.

- [139] [표1]

실시예	명칭	GLP-1/2 유사체 (서열번호)	링커 (서열번호)	Fc 영역	전체구성 (서열번호)
비교예	MG12-5	1. GLP-1/Ex4 Hyb(5) 2. GLP-2-2G(17)	비변형(34) 비변형(34)	knob hole	제1융합단백질(23) 제2융합단백질(26)
1	MG12-6	1. GLP-2-2G(17) 2. GLP-1/Ex4 Hyb(5)	글리칸(35) 비변형(34)	hole knob	제2융합단백질(27) 제1융합단백질(23)
2	MG12-7	1. GLP-1/Ex4 Hyb(5) 2. GLP-2-2G mutant(19)	글리칸(35) 비변형(31)	knob hole	제1융합단백질(24) 제2융합단백질(28)
3	MG12-8	1. GLP-1/Ex4 Hyb(5) 2. GLP-2-2G mutant(19)	비변형(31) 비변형(31)	knob hole	제1융합단백질(25) 제2융합단백질(28)
4	MG12-9	1. GLP-1/Ex4 Hyb(5) 2. GLP-2-2G(17)	비변형(31) 비변형(34)	knob hole	제1융합단백질(25) 제2융합단백질(26)

- [140] 아울러, 상기 이중 특이성 융합단백질의 경우 이중 이량체(heterodimer)가 우선적으로 생성되도록 하기 위해서 Knobs-into-holes 기술을 적용시켰다. 즉, 제1융합단백질은 하이브리드 Fc 영역 중 CH3 도메인의 10번째 아미노산인 세린(S)이

시스테인(C)으로 치환되고, 22번째 아미노산인 트레오닌(T)이 트립토판(W)으로 치환된 것(Knob)일 수 있고, 제2융합단백질은 Fc 영역 중 CH3 도메인의 5번째 아미노산인 타이로신(Y)이 시스테인(C)로, 22번째 아미노산인 트레오닌(T)이 세린(S)로, 24번째 아미노산인 류신(L)이 알라닌(A)으로, 63번째 아미노산인 타이로신(Y)이 발린(V)으로 치환된 것(Hole)일 수 있다. 이때, 상기 변이가 일어난 아미노산의 위치는 기준서열(서열번호 61의 인간 IgG1 CH3 도메인의 아미노산 서열)을 기준으로 한다. 만일 상기 CH3 도메인 상에 Knobs-into-Holes 구조와 무관한 부위에서 아미노산의 부가, 결실 또는 치환 등의 추가적인 변이가 발생한 경우라도 상기 기준서열을 기준으로 하여 해당 위치에 상응하는 아미노산이 변이된 것을 사용하면 된다. 선택적으로, 상기 Knobs-into-Holes 구조는 당업계에서 잘 알려진 다른 아미노산 변이를 통해 도입될 수 있다. 이러한 변이는 선행문헌(Wei et al., *Oncotarget* 2017, 8(31): 51037-51049; Ridgway et al., *Protein Eng.* 1996, 9(7): 617-621; Carter, P., *J. Immunol. Methods* 2001, 48(1-2): 7-15; Merchant et al., *Nat. Biotechnol.* 1998, 16(7): 677-681)에 잘 기술되어 있다. 이러한 선택적인 변이로는 예컨대 제1융합단백질의 CH3 도메인의 22번째 아미노산인 트레오닌이 타이로신으로 치환된 Knob 구조 및 제2융합단백질의 CH3 도메인의 63번째 아미노산인 타이로신이 트레오닌으로 치환된 Hole 구조의 조합을 통해 이중 특이성 이량체 융합단백질이 생성될 수 있다. 상기 Knobs-into-Holes 구조는 반대로 상기 제1융합단백질에 Hole 구조가 도입되고, 상기 제2융합단백질에 Knob 구조가 도입되어 형성될 수 있다. 상기와 같이 고안한 비교예의 이중 특이성 융합단백질 및 실시예 1 내지 4의 이중 특이성 융합단백질의 제1융합단백질 및 제2융합단백질을 암호화하는 유전자 컨스트럭트를 합성한 후, 동물세포에서 임시 발현하기 위해서 HEK293F 세포에 N293F 벡터 시스템(와이바이오로직스)을 이용하여 플라스미드 DNA 형질감염을 수행하였다. 핵산 준비를 위해 배지 3 ml에 플라스미드 DNA 25 µg을 넣어 혼합한 후, 2 mg/ml PEI(Polyethylenimine, PolyPlus, USA) 25 µg를 첨가하고 혼합하였다. 반응액은 상온에서 15분 동안 정치한 후, 1×10^6 cells/ml로 배양된 80~1000 ml의 배양액에 넣어 120 rpm, 37°C 8% CO₂의 조건으로 24시간 동안 배양하였다. DNA 형질감염 24시간 후에 영양 보충배지 성분(Soytone, BD, USA)을 최종 농도 10 g/L가 되도록 첨가하였다. 형질감염 1일 경과 후 온도를 32°C로 낮춰서 7일 차까지 배양을 진행하였다.

- [141] 상기 배양을 통해 얻어진 상층액을 Protein A 칼럼 및 이차 칼럼을 통해 정제된 비교예의 이중 특이성 융합단백질('MG12-5'로 명명함) 및 실시예 1 내지 4의 이중 특이성 융합단백질(각각, 'MG12-6', 'MG12-7', 'MG12-8', 및 'MG12-9'로 명명함)을 4X LDS 시료 완충액과 주사용수로 적절히 희석하여 최종 3-10 µg/20 µL이 되도록 조제하였다. 환원조건 시료의 경우 각 분석하고자 하는 물질과 4X LDS 시료 완충액, 10X 환원제와 주사용수를 적절히 희석하여 최종 3-10 µg/20 µL이 되도록 조제하고 95°C 가열블록에서 10분간 가열하였다. 준비된 시료를 미리 설치된 전기영동 장비에 고정된 겔의 각 웰에 20 µL씩 적재하였다. 사이즈 마커의 경

우 3~5 $\mu\text{L}/\text{well}$ 을 적재하였다. 전원공급장치를 120 V, 90분으로 설정한 후 전기영동을 수행하였다. 전기영동이 완료된 겔을 분리한 후 염색용액 및 탈-염색 용액을 이용하여 염색하고, 결과를 분석하였다.

[142] 분석결과 도 2a 내지 2d에서 확인되는 바와 같이, 모든 이중 특이성 융합단백질들은 비-환원 조건(NR)에서 50~75 kDa 사이, 환원 조건(R)에서는 37 kDa 부위에서 관찰되었다.

[143] 결론적으로, SDS-PAGE를 통하여 본 발명의 실시예에 따른 모든 이중 특이성 융합단백질이 정상적으로 생산 및 정제될 수 있었고, 특히 MG12-5와 GLP-2-Fc 동형 이량체의 비교를 통해 증명되었듯이, KiH 구조를 적용한 이중 특이성 이중 단백질의 경우 그렇지 않은 경우에 비해 단량체 형태의 불순물 형성이 현저히 저하되는 것을 확인하였다.

[144] **실험예 1: GLP-1 및 GLP-2 시험관내 활성 확인**

[145] 본 발명자들은 상기 실시예에서 제조된 이중 특이성 융합단백질의 GLP-1 및 GLP-2 시험관내(*in vitro*) 활성을 조사하였다. 구체적으로, 본 발명자들은 GLP-1 수용체의 활성평가를 위해 GLP-1 수용체를 안정적으로 발현하는 CHO-K1 세포(DiscoverX)를 이용하였다. GLP-1R 발현 CHO-K1 세포를 계대 배양하여 96-웰 흰색 플레이트에 5×10^5 cells/mL의 양으로 100 μL 씩 분주하고, 37°C의 5% CO_2 배양기에서 20-24시간동안 배양하였다. 이후 세포가 안정적으로 부착함을 확인한 뒤 약물을 최종 농도의 3배의 농도로 조제하고, 이후 플레이트에 있는 배양액을 제거한 뒤 실험용 시약 30 μL 및 GLP-1 계열의 약물을 15 μL 처리하였다. DIRANF 처리 후 30분간 37°C에서 반응시킨 이후 세포 용해용액 및 활성 평가용 시약을 총 75 μL 첨가하여 1시간 동안 상온에서 반응시키고 4-6시간의 형광반응을 유도하였다. 이를 통해 CHO-K1 세포에 GLP-1 수용체의 작용제가 결합 및 자극하게 되어 증가하는 cAMP의 양을 키트에서 제공하는 용액을 이용하여 루시퍼레이즈 활성을 Spectramax M5 기기를 이용한 생물발광 정도를 측정함으로써 약물의 활성을 평가하였다.

[146] GLP-2 수용체의 활성평가를 위해서는 GLP-2 수용체를 안정적으로 발현하는 CHO-K1 세포(DiscoverX)를 이용하였다. GLP-2R 발현 CHO-K1 세포를 사용한 것을 제외하면 상기와 동일한 방법을 이용하여 GLP-2 활성을 평가하였다. 비교예인 MG12-5의 활성은 대한민국 특허 제10-2349718호에 기재된 수치를 참조하였다.

[147] 분석 결과, 표 2 및 3에서 확인되는 바와 같이, GLP-1 활성과 관련하여, 비교예인 MG12-5의 경우 야생형 GLP-1 대비 35%의 활성을 나타낸 반면, 본 발명의 실시예 1 내지 3의 이중 특이성 융합단백질은 야생형 GLP-1 펩타이드 대비 최소 40%의 이상의 활성을 나타내어, 야생형 GLP-1과 유사하거나 그 이상의 활성을 나타내는 것으로 확인되었고, 특히 실시예 2 경우에는 야생형 GLP-1 대비 150% 이상의 고활성을 나타냈다. 아울러, GLP-2 활성의 경우 비교예인 MG12-5가 야생형 GLP-2 활성의 59%를 나타낸 것과 달리 실시예 1 내지 3의 이중 특이성 융합단

백질 모두 50% 미만의 활성을 나타냈고, 특히 실시예 2 및 3의 이중 특이성 융합 단백질은 야생형 GLP-2 대비 각각 2% 및 7% 정도의 매우 낮은 활성을 나타냈다.

[148] [표2]

본 발명의 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질의 시험관내 GLP-1 활성 분석 결과

		hGLP-1	실시예 1	실시예 2	실시예 3
GLP-1 활성 (Set1)	EC ₅₀ (nM)	0.69	1.57	0.35	0.81
	hGLP-1 peptide 대비 상대활성(%)	100	44	194	85
GLP-1 활성 (Set2)	EC ₅₀ (nM)	0.89	1.12	0.57	0.71
	hGLP-1 peptide 대비 상대활성(%)	100	79	156	125

[149] [표3]

본 발명의 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질의 시험관내 GLP-1 활성 분석 결과

		hGLP-2	실시예 1	실시예 2	실시예 3
GLP-2 활성	EC ₅₀ (nM)	1.18	2.42	50.8	19
	hGLP-2 peptide 대비 상대활성(%)	100	49	2	6

[150] 실험예 2: 체중 감량 효과 분석

[151] 2-1: 단회 투여 시 효과 분석

[152] 본 발명자들은 비교군인 MG12-5와 본 발명의 일 실시예에 따른 MG12-8의 단일투여에 의한 체중 감소 효력을 평가하였다. 구체적으로, 정상의 7주령 웅성 C57BL/6N 마우스를 입수하였고 1주간 자유 급식 및 급수를 통해 순화를 하였다. 이후 마우스의 체중을 측정하여 평균 체중이 유사하도록 무작위로 실험군 분리를 진행한 뒤 MG12 formulation buffer로 조제한 MG12-5(100 nmol/5 mL/kg), MG12-8(100 nmol/5 mL/kg), 그리고 약물을 포함하지 않는 담체(vehicle)를 마우스의 옆구리 피하에 주입하였다. 약물 투여 후 3일 뒤 마우스의 체중을 측정하여 약물에 의한 체중 감소를 평가하였다(도 3a).

[153] 그 결과, 도 3b에서 확인되는 바와 같이, vehicle 투여군의 경우 약물 주입에 의한 체중 변화는 없거나 증가함을 확인하였다. 반면 비교군인 MG12-5 투여군에서는 약물 투여 전과 매우 유사한 체중으로 유지됨을 확인하였으며, 본 발명의 일 실시예에 따른 MG12-8 투여군에서는 체중이 약 5% 정도 감소함을 확인하였다. 이를 통해 GLP-1 유사체 및 GLP-2 유사체를 포함하는 이중 특이성 융합단백질의 GLP-1 활성은 야생형 GLP-1 펩타이드 대비 상대 활성(%)이 40% 이상, 또는 융합

단백질의 GLP-2 활성은 야생형 GLP-2 펩타이드 대비 상대 활성(%)이 50% 이하가 되어야 함을 알 수 있었다.

[154] **2-2: 반복 투여시 효과 분석**

[155] 이어 본 발명자들은 비교예인 MG12-5와 본 발명의 일 실시예에 따른 MG12-8의 반복투여에 의한 체중 감소 효력을 평가하였다. 이를 위해 구체적으로 정상의 7주령 수컷 C57BL/6J 마우스를 입수하였고 1주간 자유 급식 및 급유를 거쳐 순화를 하였다. 이후 마우스의 체중을 측정하여 평균 무게가 유사하도록 무작위로 군 분리를 진행한 뒤 MG12 formulation buffer로 조제한 MG12-5(30 nmol/5 mL/kg), MG12-8(30 nmol/5 mL/kg), 그리고 약물을 포함하지 않는 담체(vehicle)를 마우스의 옆구리 피하에 2일에 1회 씩 2주간 총 7회 주입하였다. 그런 다음 최초 약물 투여일로부터 2일에 한 번씩 체중을 기록하였고, 약물 투여 전 대비 체중 변화를 백분율(%)로 나타냈었다.

[156] 그 결과, 도 3d에서 확인되는 바와 같이, vehicle 투여군과 달리 비교예 및 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질을 투여한 실험군에서 약물 투여에 의한 체중 감소가 확인되었다. 그러나, 비교예인 MG12-5를 반복 투여한 경우 이러한 체중 감량 효과가 점차 정상 수치로 회복됨을 확인하였다. 반면, 본 발명의 일 실시예에 따른 MG12-8 투여군의 경우 비교예(MG12-5) 대비 5%의 추가 체중 감소 효과가 나타났으며, MG12-5 대비 반복투여에 따른 체중 감소가 유지됨을 확인하였다.

[157] 한편, 주로 단장증의 치료에 사용되고 있는 GLP-2R 작용제의 경우 부작용으로 담낭 비대 현상이 나타나는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 발명과 같이 GLP-1R 작용제 및 GLP-2R 작용제를 모두 포함하는 이중 특이성 융합단백질의 경우 GLP-2R 작용제 활성이 너무 강할 경우, 이러한 부작용이 나타날 가능성이 존재한다. 이에, 본 발명자들은 마지막 약물 투여 다음날 마우스의 담낭(gallbladder)의 부피를 확인하기 위해 마우스를 희생시킨 후 자를 담낭 주변에 대고 사진을 찍어 담낭의 부피를 측정하였다.

[158] 그 결과, 도 3e에서 확인되는 바와 같이, 약물 반복투여에 의한 담낭 비대현상을 관찰한 결과 vehicle 투여군 대비 비교군(MG12-5 투여군)에서는 담낭의 부피가 2.3배 증가하였으나, 본 발명의 일 실시예에 따른 MG12-8 투여군에서는 담낭의 부피가 vehicle 투여군과 통계적으로 차이가 없음을 확인하였다. 이를 통해 본 발명의 이중 특이성 융합단백질의 GLP-2 활성은 야생형 GLP-2 펩타이드 대비 상대 활성(%)이 50% 미만이어야 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다.

[159] **실험예 3: 장 누수를 동반하는 대사이상연관 지방간염 치료효과 분석**

[160] 이어 본 발명자들은 비교군인 Liraglutide 및 본 발명의 일 실시예에 따른 MG12-8의 장 누수를 동반하는 대사이상연관 지방간염 모델 동물에서의 체중 감소 및 장 누수현상 조절능을 조사하였다. 이를 위해 구체적으로, 본 발명자들은 20주령의 웅성 C57BL/6J 마우스를 입수하였고, 콜린-결핍 고 지방 식이(CD-HFD)식으로 과체중을 유도하였다. 또한 DSS(덱스트란 황산나트륨염, dextran

sulfate sodium) 를 1%의 낮은 농도로 7일간 처리 후 10일간 음수로 변경하는 순환을 통해 장 누수(leaky gut) 현상을 유도하였다. 첫 CD-HFD 식이 시작 2주 경과 후 Liraglutide 및 MG12-8 약물을 각각 주어진 투여량과 투여 간격으로 피하 주입하였고 첫 약물투여일로부터 2주 후 체중을 측정하였다(도 4a). 장 누수를 확인하기 위해 FITC(플루오레세인이소티오시안산염, Fluorescein isothiocyanate)-Dextran(4 kDa)용액을 마우스 희생 4시간 전 구강으로 주입한 후 식이를 중단하였고, 이후 혈액으로 이동한 FITC-Dextran의 양을 혈중 형광을 측정하여 평가하였다.

- [161] 그 결과 도 4b에서 확인되는 바와 같이, vehicle 투여군의 최종 체중은 약 37 g으로 정상체중 범위인 30 g 대비 20% 이상 높은 것으로 확인되었다. 반면, Liraglutide 투여군 및 본 발명의 일 실시예에 따른 MG12-8 투여군에서는 vehicle 투여군 대비 모두 체중의 감소가 확인되었으며, 이 중 본 발명의 일 실시예에 따른 MG12-8에 의해 가장 효과적인 체중 감량 효력이 확인되었다.
- [162] 한편, 장 누수에 대한 효과를 분석한 결과, 도 4c에서 확인되는 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 MG12-8은 대조군 대비 우수한 장 누수 억제 활성을 나타냈다. 반면, Liraglutide은 대조군 대비 장 누수 억제 활성을 나타내지 않았다.. 더구나, 비교군인 Liraglutide는 55 nmol/kg의 고용량 투여에 하루 2회 투여한 반면, 본 발명의 일 실시예에 따른 MG12-8은 15 nmol/kg의 상대적으로 낮은 투여량을 사용한 것이고, 투여 간격도 주 3회로 하루 2회인 Liraglutide와 비교하여 4배 이상 길다는 점을 고려하면 환자 편의 측면에서도 더 우수한 물질임을 알 수 있다.

[163] **실험예 4: 생체 내 GLP-1 활성 분석**

- [164] 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따른 MG12-8의 생체 내에서의 GLP-1 활성을 분석하였다. 이를 위해 구체적으로 본 발명자들은 RP-HPLC를 통해 시험관내 GLP-1 활성이 상이한 4 가지의 MG12-8 시료를 확보하였다. 구체적으로 네 가지 시료는 RP-HPLC 분석 결과 1번 피크와 3번 피크의 면적상의 차이를 나타냈는데, 1번 시료의 경우 1번 피크의 면적이 작았고, 시료번호가 올라갈수록 1번 피크의 면적이 증가하였으며, 3번 피크는 반대로 시료번호가 올라갈수록 그 면적이 감소하였다(표 4). 이렇게 1번 피크와 3번 피크의 면적의 비율이 상이한 네 가지 시료에 대하여 GLP-1R을 안정적으로 발현하는 HEK-GLP-1R 세포(eEnzyme)를 이용하여 시험관내 GLP-1 활성을 분석하였다. 구체적으로, 상기 HEK-GLP-1R 세포를 계대 배양하여 96-웰 검정 플레이트에 3×10^5 cells/mL의 양으로 100 μ L씩 분주하고, 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 20-24시간동안 배양하였다. 이후 세포가 안정적으로 부착함을 확인한 뒤 약물을 최종 농도의 5배의 농도로 조제하고, 이후 플레이트에 있는 배양액을 제거한 뒤 실험용 시약 및 GLP-1 계열의 약물을 적정량 처리하였다. 2시간동안 약물과 반응시킨 이후 증가하는 cAMP의 양을 키트에서 제공하는 용액과 Spectramax M5 기기를 이용하여 생물발광 정도를 측정함으로써 약물의 활성을 평가하였다.

- [165] [표4]
시료에 따른 RP-HPLC 분석 결과

시료	1번 피크 (%)	3번 피크 (%)
#1	11.9	71.3
#2	34.0	54.0
#3	57.9	33.6
#4	67.5	24.9

- [166] 그 결과, 도 5a에서 확인되는 바와 같이, 상대적 GLP-1 활성은 1번 시료가 100%, 2번 시료가 약 200%, 3번 시료가 약 300% 그리고 4번 시료가 약 400%인 것으로 확인이 되었다. 이어, 본 발명자들은 상기와 같이 시험관내 GLP-1 활성이 다른 네 가지 시료를 동물실험에 사용하여 생체 내 GLP-1 활성을 조사하였다. 구체적으로, 이를 위해 본 발명자들은 복강투여 당내성 분석(IPGTT)을 수행하였는데, IPGTT 시작 18시간 전에 약물을 투여한 뒤 사료와 깔짚을 제거하여 단식을 시작하였다. 그런 다음 약물투여 18시간 이후 복강으로 20%의 포도당 용액을 투여하기 전과 투여한 후 시간 흐름에 따른 혈당의 변화를 관찰하였다(도 5b).
- [167] 그 결과 도 5c에서 확인되는 바와 같이, 시험관내 GLP-1의 활성이 100-300%를 나타내는 시료의 경우 생체 내 혈당 억제 효력이 유사하게 나타남을 확인하였다. 한편, 시험관내 GLP-1 활성이 400%로 나타난 시료는 100% 시료 대비 생체 내 혈당 억제 효력이 더 높은 것으로 나타났다. 이를 통해, 시험관내 조건에서 야생형 GLP-1 펩타이드 대비 GLP-1 활성이 100-300%인 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질은 생체 내 조건에서는 유사한 효능을 나타냄을 알 수 있었다.
- [168] **실험예 5: 고지방 식이 모델에서의 비만 치료효과 분석**
- [169] **5-1: 종래 GLP-1R/GLP-2R 이중 작용제 대비 효과 비교 분석**
- [170] 본 발명자들은 이어 종래에 보고된 GLP-1R/GLP-2R 이중 작용제와 비교하여 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질이 비만 치료를 분석하고자 하였다. 이를 위해 구체적으로, 본 발명자들은 기존 알려진 GLP-1R/GLP-2R 이중 작용제 펩타이드 물질(Dapiglutide mimetic)과의 효능 비교를 위해 30 nmol/kg의 Dapiglutide mimetic과 MG12-8(이하, 편의상 'MG12'로 표기함) 15 및 30 nmol/kg 처리에 의한 체중 감소 및 체성분 변화를 조사하였다. 체성분 분석을 위해 마우스를 Minispec LF50 (Bruker biospin, BCA LF50)기기를 이용하여 몸 전체의 체지방 중량(fat mass) 및 근육 및 뼈 등의 중량(lean mass)을 각각 측정하였고, 약물에 의한 체성분 변화를 관찰하기 위해 약물투여 전과 2주 간의 약물투여 후 체성분의 변화율을 측정하였다. 이를 위해 5주령의 정상 C57BL/6N 웅성 마우스를 입수하였고, 1주간의 순화 이후 60%의 고지방 식이(HFD)를 처리하여 식이-유도 비만(DIO)을 유도하였다. 첫 HFD로부터 16주 이후 적절하게 조제한 Dapiglutide mimetic과 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질(MG12)을 마우스의 옆구리 피하에 2일에 1회 씩 주입하였다.

- [171] 약물 투여 전과 2주 약물 투여 후 변화한 체중 및 체성분 변화율을 분석한 결과, 도 6a의 좌측 그래프에서 확인되는 바와 같이, Dapiglutide mimetic 30 nmol/kg 투여에 의해 약 5%의 체중 감소가 나타난 반면, 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질(MG12) 15 nmol/kg 투여 시 13%, 그리고 30 nmol/kg 투여 시 약 20%의 체중 감소율을 나타냄을 확인할 수 있었다.
- [172] 아울러, 실험을 종료하고 실험동물을 희생시킨 후 지방 조직과 비지방조직의 중량비를 측정한 결과, 도 6a의 우측 그래프에서 확인되는 바와 같이, 정상식이 및 고지방식이군에서는 서로 유사한 양성의 지방 중량 증가율을 보였으나, Dapiglutide mimetic 투여군 및 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질 투여 군에서는 체성분 중 지방의 감소가 나타냄을 확인하였다. 특히, Dapiglutide mimetic 투여군에서는 약 6%의 감소를 보인 반면 15 nmol/kg의 MG12 투여군에서는 약 18%, 30 nmol/kg를 처리한 군에서는 약 35%의 지방 비율 감소가 나타냄을 확인하여 기존 물질 대비 비만 치료효과가 매우 우수한 물질임을 알 수 있었다.
- [173] **5-2: 농도의존적 효과 분석**
- [174] 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질(MG12)의 생체 내 효과가 농도 의존적으로 나타나는지 여부를 확인하기 위해, 다양한 농도의 이중 특이성 단백질을 이용하여 고지방식이 비만 모델 동물에서의 체중 감량 효과를 분석하였다. 구체적으로 본 발명자들은, MG12의 농도에 따른 체중감량 효력을 평가하기 위해 5주령의 정상 C57BL/6 웅성 마우스를 입수하였고, 1주간의 순화 이후 60%의 고지방식이(HFD)를 처리하여 식이-유도 비만(DIO)을 유도하였다. 첫 HFD로부터 16주 이후 MG12를 MG12 formulation buffer를 이용하여 15, 30, 그리고 60 nmol/5 mL/kg로 조제하였고, 2일에 1회 씩 마우스의 복부 피하에 투여하였다. 마우스의 체중에 따라 평균 체중이 유사하도록 임의로 군분리한 후 약물투여 후 체중 변화를 백분율(%)로 표기하였다.
- [175] 그 결과, 도 6b에서 확인되는 바와 같이, 정상식이군 및 HFD식이군 모두 2주간 체중이 유지 혹은 증가하는 경향을 나타냈다. 그러나 MG12를 투여한 군에서는 농도의 증가에 따라 약 13~25%의 체중 감량 효력을 나타냄을 확인할 수 있었으며, 이러한 체중 감량 효과는 농도의존적으로 나타났다.
- [176] 이어, 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질의 효과가 GLP-1 펩타이드 및 GLP-2 펩타이드의 단순 병용 투여와 유사한 효과인지 여부를 확인하기 위해, 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질의 융합 파트너인 GLP-1-Fc와 GLP-2-Fc를 별도로 제조하여 이를 단순 병용 투여한 것(30 nmol/kg + 30 nmol/kg)과 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질(MG12)의 동일 몰 농도(30 nmol/kg) 투여시 체중 변화를 비교 분석하였다.
- [177] 그 결과, 도 6c에서 확인되는 바와 같이, GLP-1-Fc와 GLP-2-Fc 단일물질의 단순 병용과 비교하여 동일 용량의 MG12에 의해 체중 감량이 약 5% 더 향상됨을 확인할 수 있었다.

[178] **5-3: 지방 특이적 무게 감소 효과 분석**

[179] 본 발명자들은 종래 비만 치료제로 사용되고 있는 GLP-1R/GIPR 펩타이드 이중 작용제인 Tirzepatide mimetic과 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질의 지방 특이적 무게 감소 효과를 비교 분석하였다. 구체적으로 본 발명자들은 5주령의 정상 C57BL/6 웅성 마우스를 입수하였고, 1주간의 순화 이후 60%의 고지방 식이(HFD)를 처리하여 식이-유도 비만(DIO)을 유도하였다. 첫 HFD로부터 16주 이후 Tirzepatide mimetic과 MG12를 MG12 formulation buffer를 이용하여 각각 15와 60 nmol/5 mL/kg로 조제한 뒤 피하 투여하였다. 체성분 분석을 위해 마우스를 Minispec LF50(Bruker biospin, BCA LF50)기기를 이용하여 몸 전체의 체지방 중량(fat mass) 및 근육 및 뼈 등의 중량(lean mass)을 각각 측정하였고, 약물에 의한 체성분 변화를 관찰하기 위해 약물투여 전과 2주 간의 약물투여 후 체성분의 변화율을 관찰하였다.

[180] 그 결과, 도 6d에서 확인되는 바와 같이, 대조군(vehicle 투여군) 대비 2주간 15 nmol/kg의 Tirzepatide mimetic 및 60 nmol/kg의 MG12 처리에 의해 둘 모두 서로 유사한 23%의 체중이 감량을 보임을 확인할 수 있었다. 아울러, 도 6e에서 확인되는 바와 같이, Tirzepatide mimetic에 의한 지방 무게의 감소율 44% 대비 MG12 처리에 의해 약 52%의 체지방 감소가 나타남을 확인할 수 있었다. 반면, 도 6f에서 확인되는 바와 같이, 근육 감소량을 측정한 결과, Tirzepatide mimetic 투여군의 14% 감소 대비 MG12 투여군에서는 약 7%만 감소하는 것으로 확인되었다.

[181] **5-4: 내장 지방 억제 효력 분석**

[182] 이어 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질의 지방 감소 효과가 피하지방의 감소에 따른 것인지 아니면 내장지방의 감소에 따른 것인지 여부를 조사하고자 하였다. 이를 위해 구체적으로, 본 발명자들은 상기 실험예 6-3의 실험 종료 후 실험 동물을 희생시킨 후 피하지방과 내장지방을 적출하여, 이들 각각의 중량을 측정하였고, 이를 체중과 나누어 각 지방조직의 체지방율로 환산하였다.

[183] 그 결과, 도 6g의 좌측 그래프에서 확인되는 바와 같이, 피하지방(subcutaneous fat)의 경우 Tirzepatide mimetic과 MG12 모두 대조군(vehicle 투여군) 대비 피하지방율이 유사하거나 감소하는 경향이 나타남을 확인하였으나 통계적 유의성은 없음을 확인하였다. 반면, 내장지방(visceral fat)에 대한 체지방율을 조사한 결과, 도 6g의 우측 그래프에서 확인되는 바와 같이, vehicle 투여군 대비 Tirzepatide mimetic 투여군에 의해 정상 마우스인 대조군(control) 수준으로 감소한 것으로 나타났다. 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질 투여군(MG12)의 경우는 Tirzepatide mimetic 투여군보다도 내장지방 함량이 더 낮아서, 비만 동물에서 내장지방의 감소에 매우 효과적인 물질임을 알 수 있었다.

[184] **실험예 6: 내독소 및 간손상 치료 효과 분석**

[185] 비만 상태를 방지할 경우 대사이상연관 지방간 질환(NAFLD) 또는 대사이상연관 지방간염(NASH) 더 나아가 비가역적 간손상 질환인 간경화(liver cirrhosis)

까지 진행될 수 있다. 이에, 본 발명자들은 본 발명자들은 비만 모델 동물에서 잘 발생하는 증상인 대사성 내독소증(blood endotoxemia) 증가 및 간손상을 억제할 수 있는지 여부를 조사하고자 동일 효력 농도의 GLP-1/GIPR 이중 작용제인 Tirzepatide mimetic과 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질(MG12)을 2주간 투여한 후 혈청을 확보하여, 성분 분석을 수행하였다. Endotoxemia 분석을 위해 mouse LPS ELISA 키트(CSB-E13066m, Cusabio)를 이용하여 분석하였고, 간손상 분석을 위해 dry-chem 장비(DRI-CHEM NX-500, FUJI)를 이용하여 ALT의 수치를 측정하였다.

- [186] 그 결과 도 7a에서 확인되는 바와 같이, 식이-유도 비만(DIO)에 의해 혈청 내 LPS(lipopolysaccharide)의 양이 증가하여 내독소혈증(endotoxemia)이 유발됨을 확인하였으며, 이 수치는 Tirzepatide mimetic 투여 시 감소되지 않았으나, 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질의 투여 시 대조군 수준으로 감소됨을 확인할 수 있었다. 덧붙여, 간손상 정도를 분석한 결과, 도 7b에서 확인되는 바와 같이, 식이-유도 비만에 의해 간손상이 발생하여 ALT 수치가 크게 증가함을 확인할 수 있었다. Tirzepatide mimetic 투여군에서는 ALT 수치가 vehicle 투여군 대비 절반 수준으로 감소하였으며, 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질(MG12) 투여군의 경우 Tirzepatide mimetic 투여군 대비 통계적으로 유의한 수준으로 향상된 ALT 수치 감소 효과를 확인할 수 있었다.

[187] 실험예 7: 포도당 흡수 효과 분석

- [188] 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따른 이중특이성 융합단백질이 당뇨병의 치료에 사용될 수 있는지 여부를 확인하기 위해, 마우스 지방 전구세포(pre-adipocyte)인 3T3-L1 세포와 랫트 근모세포(myoblast)인 L6-GLUT4myc 세포(제공자: From the laboratory of Amira Klip, PhD, Hospital For Sick Children)를 대상으로 2-NBDG 포도당 흡수 분석을 수행하였다.

- [189] 구체적으로, 24-웰 플레이트에서 배양중인 포화상태의 3T3-L1 지방 전구세포의 배양액을 24-분화유도 배지[10% FBS(Cytiva, USA), 1% Penicillin/Streptomycin (P/S, Cytiva, USA), 1 μ M dexamethasone (DEXA, Sigma, USA), 0.5 mM 3-isobutlyl-1-methylxanthine(IBMx, Sigma, USA), 2 μ M Rosiglitazone (Cayman, Germany) 및 1 μ g/ml 인슐린(Sigma, USA) 함유된 DMEM 배지]로 교환한 후 CO₂ 5% 조건에서 11일 동안 배양함으로써 지방세포로 분화를 유도하였다. 분화된 세포를 인슐린 결핍 상태로 만든 후 본 발명의 일 실시예에 따른 이중특이성 융합단백질 MG12(300 nM)과 10 μ g/ml 인슐린을 처리한 뒤 100 μ g/mL의 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-Deoxyglucose(2-NDBG, Cayman, USA)를 포함한 글루코스가 들어있지 않은 DMEM에서 배양하였다. 양성 대조군으로 는 동일 용량(300 nM)의 Semaglutide, Tirzepatide 및 Retatrutide를 사용하였다. 30 분 동안 배양한 후 세포를 글루코스가 없는 DMEM 배지로 세척하고 용해 완충액(RIPA buffer)으로 20분 동안 배양하였다. Microplate reader(SpectraMax M3, USA)

를 이용하여 485 nm 여기파장과 535 nm 방출파장에서 각각 형광 신호를 측정하였다.

- [190] 마찬가지로, 랫트 L6-GLUTmyc 근육세포를 24-웰 플레이트에 2×10^4 cells/well 밀도로 파종하고 2일 뒤 1% 페니실린 스트렙토마이신(penicillin streptomycin), 2% FBS(Cytiva, USA)가 함유된 α -MEM media(Gibco, USA)으로 배지를 갈아서 5일 동안 근육세포를 분화시켰다. 분화 후 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질 MG12(300 nM)과 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 인슐린을 처리하였다. 이어, 2-NDBG를 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 30분 처리하였다. α -MEM media로 세척한 후 용해완충액으로 배양한 뒤 Microplate reader(SpectraMax M3, USA)로 485 nm(여기파장), 535 nm(방출파장)에서 세포 내 2-NDBG 함량을 측정하였다.
- [191] 그 결과, 도 8에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질(MG12)은 분화된 지방세포는 물론 근섬유에서의 포도당 흡수 효율이 GLP-1-Fc나 GLP-2-Fc는 물론 기존의 GLP-1 유사체(Semaglutide) 그리고 GLP-1R/GLP-2R 이중작용제(Dapiglutide) 보다 더 우수한 것으로 확인이 되었다.
- [192] **실험예 8: 당뇨병 치료효과 검증 동물 실험**
- [193] **8-1: 공복혈당, 혈중 인슐린 농도, HOMA-IR 및 HOMA- β 점수 분석**
- [194] 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질이 혈당강화는 물론 인슐린 저항성을 개선하는지 여부를 확인하기 위해 당뇨 모델 마우스를 이용한 동물실험을 수행하였다.
- [195] 구체적으로, 본 발명자들은 14주령의 웅성 db/db 마우스(Janvier Labs, France)에 지정된 투여량의 Semaglutide, Tirzepatide 또는 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질 MG12-8을 12주 동안 3일에 한 번씩 피하 주사로 투여하였다.
- [196] 그런 다음 25일 간격으로 실험 시작 25일, 50일 및 75일째 혈중 비공복(non-fasting) 혈당 수치를 측정하였고 한 달 간격으로 3달째까지 혈중 당화혈색소(HbA1c) 수치를 측정하였다. 아울러, 실험 종료 후 공복 혈당 및 혈중 인슐린 농도 그리고 HOMA-IR 및 HOMA- β 점수를 산출하였다.
- [197] 그 결과, 도 9에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질(MG12)은 $30 \text{ nmol}/\text{kg}$ 의 투여량에서 $30 \text{ nmol}/\text{kg}$ 의 Semaglutide나 $15 \text{ nmol}/\text{kg}$ 의 Tirzepatide보다 현저하게 우수한 비공복 혈당 강하능 및 혈중 당화혈색소(HbA1c) 수치를 낮추는 것으로 확인되었으며, 공복 혈당 역시 현저하게 낮출 뿐 아니라, 공복 혈중 인슐린 농도는 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다. 더구나, $30 \text{ nmol}/\text{kg}$ 의 Semaglutide나 $15 \text{ nmol}/\text{kg}$ 의 Tirzepatide의 경우 모두 40을 초과하여 인슐린 저항성이 제거되지 않았던 반면, 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질은 대조군 수준으로 HOMA-IR 점수를 낮추었고, 베타-세포 기능을 나타내는 HOMA- β 점수 역시 $30 \text{ nmol}/\text{kg}$ 의 Semaglutide나 $15 \text{ nmol}/\text{kg}$ 의 Tirzepatide와 비교하여 현저하게 높은 수치를 나타냄으로써 제2형 당뇨병은 물론 제1형 당뇨병의 치료에 적용될 가능성을 타진하였다.
- [198] **8-2: 조직학적 분석**

- [199] 이어 본 발명자들은 상기 실험 종료 후 실험동물을 희생시킨 후, 췌장 조직에 대한 조직학적 분석을 수행하였다.
- [200] 구체적으로, 상기 동물실험 종료 후 실험동물을 전신 마취함으로써 희생시킨 후 췌장을 적출한 후, 4% 파라포름알데히드에 고정시키고 파라핀으로 포매시킨 다음, 마이크로톰을 사용하여 조직을 횡단 절편(5 μm)으로 절단한 후, 인슐린 단독으로 염색하거나, 인슐린과 글루카곤에 대하여 이중 염색 하거나, 인슐린 및 Ki-67에 대한 이중염색을 수행하였다. 이중 염색은 모두 형광-표지된 항체를 이용하여 수행한 뒤, 공초점 레이저 현미경을 이용하여 촬영하였다.
- [201] 그 결과, 도 10에서 확인되는 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 단백질은 종래 당뇨병 치료제인 Semaglutide 및 Tirzepatide와는 달리 췌도 면적을 유의하게 증가시켰을 뿐만 아니라, 전체 췌도 중 베타-세포의 면적 역시 매우 현저하게 증가시켰으며, 알파-세포의 경우에는 오히려 감소시켰고, 10,000 μm^2 당 Ki-67 양성 세포의 수 역시 현저하게 증가시켰다. 양성 대조군인 Semaglutide는 유의한 증가를 나타내긴 하였으나, 동일 투여량의 MG12 대비 그 효과가 낮았고, Tirzepatide는 대조군 대비 전혀 개선이 되지 않았다.
- [202] 이러한 결과는, 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질이 종래의 당뇨병 치료제와 달리 췌장 베타-세포의 보호효과가 매우 높은 물질임을 시사하는 것이다.
- [203] 상술한 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질은 안전하면서도 매우 효과적으로 비만 동물의 체중 감소 및 내장 지방 함량의 감소효과를 나타냈고, 제2형 당뇨병 물론 제1형 당뇨병을 포함한 당뇨병, 그리고 비만 등의 상태가 지속됨에 따라 발생하는 간손상 등 대사성 질환의 치료에 매우 효과적인 물질임이 확인되었다.
- [204] 본 발명은 상술한 실시예 및 실험예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.
- 산업상 이용가능성**
- [205] 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 특이성 융합단백질은 의약, 특히, 비만, 당뇨, 및 대사이상연관 지방간염 등의 대사성 질환의 치료를 위한 의약으로 사용이 가능하다.

청구범위

- [청구항 1] GLP-1 유사체 및 GLP-2 유사체가 융합된 이중 특이성 융합단백질에 있어서,
상기 GLP-1 유사체의 활성은 야생형 GLP-1(인간 GLP-1 펩타이드) 대비 40% 이상이고, 상기 GLP-2 유사체의 활성은 야생형 GLP-2(인간 GLP-2 펩타이드) 대비 50% 이하인, 이중 특이성 융합단백질.
- [청구항 2] GLP-1 유사체가 항체 Fc 영역에 연결된 제1융합단백질 및 GLP-2 유사체가 항체 Fc 영역에 연결된 제2융합단백질을 포함하며, 상기 제1융합단백질 및 제2융합단백질의 이량체화에 의해 생성되는 이중 특이성 융합단백질에 있어서,
상기 GLP-1 유사체의 활성은 야생형 GLP-1(인간 GLP-1 펩타이드) 대비 40% 이상이고, 상기 GLP-2 유사체의 활성은 야생형 GLP-2(인간 GLP-2 펩타이드) 대비 50% 이하인, 이중 특이성 융합단백질.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 GLP-1 유사체는 시험관내 조건에서의 활성이 야생형 GLP-1 대비 적어도 80% 이상인, 이중 특이성 융합단백질.
- [청구항 4] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 GLP-2 유사체는 시험관내 조건에서의 활성이 야생형 GLP-2 대비 적어도 2% 이상인, 이중 특이성 융합단백질.
- [청구항 5] 제1항 또는 제2항에 있어서,
반감기 증가 모이어티가 부가된, 이중 특이성 융합단백질.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 반감기 증가 모이어티는 상기 GLP-1 유사체와 GLP-2 유사체 사이에 삽입이 되거나 전체 융합단백질의 N-말단 또는 C-말단에 부가된 것인, 이중 특이성 융합단백질.
- [청구항 7] 제5항에 있어서,
상기 반감기 증가 모이어티는 항체 Fc 영역, PEG, XTEN, PAS(Pro-Ala-Ser), ELP(elastin-like peptide), 글리신-풍부 HAP(homo-amino-acid polymer), GLP(gelatine-like protein), 또는 혈청 알부민인, 이중 특이성 융합단백질.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
GLP-1 및 GLP-2가 중간 펩타이드(intervention peptide)에 의해 연결된 프로글루카곤 또는 그의 유사체가 아니라, 상기 GLP-1 유사체 및 GLP-2 유사체가 직접 연결되거나 두 펩타이드가 상기 중간 펩타이드가 아닌 다른 형태의 링커 펩타이드에 의해 연결된 융합단백질인, 이중 특이성 융합단백질.
- [청구항 9] 제1항 또는 제2항에 있어서,

- 상기 GLP-1 유사체는 GLP-1, 엑센딘 3(Exendin 3), 엑센딘 4(Exendin 4), GLP-1/Exendin 4 하이브리드 펩타이드, GLP-1-XTEN, Exendin 4-XTEN, Lixisenatide, Albiglutide, Liraglutide, 또는 Taspoglutide 또는 이들 중 어느 하나 이상이 연결된 연속적 반복체인, 이중 특이성 융합단백질.
- [청구항 10] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 GLP-2 유사체는 GLP-2, GLP-2^{A2G} 변이체, GLP-2^{N16G_L17Q} 변이체, GLP-2^{A2G_N16G_L17Q} 변이체, Glapaglutide, 또는 GLP-2 analogue 10인, 이중 특이성 융합단백질.
- [청구항 11] 제2항에 있어서,
상기 항체 Fc 영역은 둘 이상의 이소타입의 항체 Fc 영역이 섞인 하이브리드 Fc 영역인, 이중 특이성 융합단백질.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 하이브리드 Fc 영역은 서열번호 12 내지 16으로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 이중 특이성 융합단백질.
- [청구항 13] 제2항에 있어서,
상기 항체 Fc 영역은 이형 이량체화 모이어티가 형성된 항체 Fc 영역인, 이중 특이성 융합단백질.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 이형 이량체화 모이어티는 Knobs-into-Holes(KiH), KiH_{s,s}, HA-TF, ZW1, 7.8.60, DD-KK, EW-RVT, EW-RVT_{s,s}, SEED 또는 A107인, 이중 특이성 융합단백질.
- [청구항 15] 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 이중 특이성 융합단백질을 포함하는 조성물.
- [청구항 16] 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 이중 특이성 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
상기 대사성 질환은 비만, 당뇨병, 대사증후군, 대사이상연관 지방간 질환, 대사이상연관 지방간염, 간섬유증 또는 간경변인, 약학적 조성물.
- [청구항 18] 제17항에 있어서,
상기 당뇨병은 제1형 당뇨병 또는 제2형 당뇨병인, 약학적 조성물.
- [청구항 19] 대사성 질환의 치료에 사용되는 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 이중 특이성 융합단백질.
- [청구항 20] 제19항에 있어서,
상기 대사성 질환은 비만, 당뇨병, 대사증후군, 대사이상연관 지방간 질환, 대사이상연관 지방간염, 간섬유증 또는 간경변인, 이중 특이성 융합단백질.
- [청구항 21] 제20항에 있어서,

- 상기 당뇨병은 제1형 당뇨병 또는 제2형 당뇨병인, 이중 특이성 융합단백질.
- [청구항 22] 대사성 질환의 치료제의 제조를 위한 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 이중 특이성 융합단백질의 용도.
- [청구항 23] 제22항에 있어서,
상기 대사성 질환은 비만, 당뇨병, 대사증후군, 대사이상연관 지방간 질환, 대사이상연관 지방간염, 간섬유증 또는 간경변인, 용도.
- [청구항 24] 제23항에 있어서,
상기 당뇨병은 제1형 당뇨병 또는 제2형 당뇨병인, 용도.
- [청구항 25] 치료적으로 유효한 양의 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 이중 특이성 융합단백질을 대사성 질환에 걸린 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 상기 개체의 대사성 질환의 치료방법.
- [청구항 26] 제25항에 있어서,
상기 대사성 질환은 비만, 당뇨병, 대사증후군, 대사이상연관 지방간 질환, 대사이상연관 지방간염, 간섬유증 또는 간경변인, 방법.
- [청구항 27] 제26항에 있어서,
상기 당뇨병은 제1형 당뇨병 또는 제2형 당뇨병인, 방법.